
Strukturelle und funktionelle Analysen von phytatspaltenden Enzymen aus Enterobacteriaceae

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Dipl. Biol. Thomas Herter
geboren am 19.06.1974 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. Rainer Borriss
2. Prof. Dr. Wolfgang Höhne
3. Prof. Dr. Ortwin Simon

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2009

Zusammenfassung

Einigen sauren Histidinphosphatasen (HAPs), besonders den mikrobiellen Phytasen, wird eine große Bedeutung bei dem enzymatischen Abbau des Phytats in Futtermitteln zugeschrieben. Neben den bereits charakterisierten Phytasen aus *E. coli*, *Klebsiella sp.* ASR1 und *Aspergillus sp.* gehört auch die Glukose-1-Phosphatase Agp aus *E. coli* zu den phytatspaltenden Histidinphosphatasen. Trotz hoher struktureller Ähnlichkeiten besitzen diese Enzyme teilweise große Unterschiede in Hydrolysegeschwindigkeiten und den Phytatabbauwegen. Damit ist naheliegend, dass die sequenziellen und die geringen strukturellen Unterschiede für die veränderten Eigenschaften, wie z. B. spezifische Phytaseaktivitäten, verantwortlich sind.

In dieser Arbeit wurde die Funktionsweise der HAPs an zwei ausgewählten Vertretern, an der Phytase aus *Klebsiella sp.* ASR1 (PhyK) und der Glukose-1-Phosphatase aus *Enterobacter cloacae* (AgpE), untersucht. Neben den biochemischen Charakterisierungen der beiden Enzyme und Substitutionsmutanten konnten die Proteinstrukturen beider Enzyme durch Kristallstrukturanalysen aufgeklärt werden. Die Kokristallisationen mit Phytat bzw. *myo*-Inositolhexasulfat waren ebenfalls erfolgreich und ermöglichten die Modellierungen der Substratbindungen in den aktiven Zentren beider Enzyme. Hier konnten für die Glukose-1-Phosphatase AgpE zum ersten Mal zwei Konformationszustände, eine offene und eine geschlossene Form, ähnlich der *E. coli* Phytase (AppA) gezeigt werden. Ungeachtet deutlicher funktioneller Unterschiede wiesen die AgpE und AppA starke strukturelle Ähnlichkeiten auf. Deshalb wurden gezielte Aminosäuren-Substitutionen im aktiven Zentrum der AgpE durchgeführt, um deren Eigenschaften zu modifizieren. Bereits der Austausch von nur zwei Aminosäuren führte zu einem deutlich veränderten Substratspektrum der AgpE und bewirkte einen weiteren, hier zum ersten Mal gezeigten, Phytatabbau durch eine Glukose-1-Phosphatase.

Die PhyK aus *Klebsiella sp.* ASR1 wurde ebenfalls verschiedenen Substitutionsmutagenesen unterzogen. Hierbei wurden Phytasevarianten erzeugt, die bis zu 20 % höhere spezifische Aktivitäten und damit einen effizienteren Phytatabbau aufwiesen sowie außerdem eine deutlich verringerte Substrathemmung zeigten. Aus den "High Performance Ion Chromatography" Analysen (HPIC) des Phytatabbaus der nativen *Klebsiella*-Phytase und der Mutanten konnten Rückschlüsse auf die Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Substratbindung und daher auch auf den Spaltmechanismus gezogen werden. Hierbei konnte auch gezeigt werden, dass der kombinierte Einsatz der effizienteren Phytasemutante mit der nativen AppA aus *E. coli* eine deutlich schnellere, vollständige Phytathydrolyse bewirkte und somit einen interessanten Aspekt für die Anwendung in der Tierernährung darstellt.

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
A. bidest	zweifach deionisiertes Wasser
AS-Rest	Aminosäurerest
AS-Sequenz	Aminosäuresequenz
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
BSA	Bovinseryumalbumin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	Fast protein liquid chromatography
G1P	Glukose-1-Phosphat
G1Pase	Glukose-1-Phosphatase
HAP(s)	saure Histidinphosphatase(n)
HPIC	High Performance Ion Chromatography
InsP1	<i>myo</i> -Inositolmonophosphat
InsP2	<i>myo</i> -Inositoldiphosphat
InsP3	<i>myo</i> -Inositoltriphosphat
InsP4	<i>myo</i> -Inositoltertrakisphosphat
InsP5	<i>myo</i> -Inositolpentakisphosphat
InsP6	<i>myo</i> -Inositolhexakisphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITC	Isotherme Titrations Calorimetrie
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NC-IUBMB	Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
PM	Punktmutation
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
RP	Randompunkt
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOE	Splicing by overlap extension
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
G6P	D-Glukose-6-Phosphat
F1P	D-Fruktose-1-Phosphat
F6P	Fruktose-6-Phosphat
ÜN	über Nacht

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1.	Das Phytat und die Inositolphosphate	1
1.1.1.	Struktur und Eigenschaften der Phytinsäure	1
1.1.2.	Vorkommen und Bedeutung von Inositolphosphaten	3
1.2.	Bedeutung von phytatspaltenden Enzymen	4
1.3.	Phytasen	5
1.3.1.	Die β -Propeller-Phytasen	7
1.3.2.	Die sauren Purpurphosphatasen	9
1.3.3.	Die Inositolpolyphosphatase aus <i>Selenomonas ruminantium</i>	10
1.3.4.	Die sauren Histidinphosphatasen	11
1.3.4.1.	Struktur und molekulare Eigenschaften der sauren Histidin- Phosphatasen	13
1.3.4.2.	Die katalytische Aktivität der sauren Histidinphosphatasen und Phytatabbauwege der mikrobiellen Phytasen	14
1.4.	Zielstellung	15
2.	Ergebnisse	
2.1.	Expression der <i>Klebsiella</i> Phytase	17
2.1.1.	Expression der Phytase im <i>E. coli</i> -Expressionssystem	17
	Reinigung mittels Ni-NTA-Säule	18
	Reinigung der Phytase mittels FPLC (HiTrap-Säule)	19
2.1.2.	Expression der <i>Klebsiella</i> -Phytase in <i>Arxula adenivorans</i> und Reinigung aus dem Kulturüberstand	21
2.1.3.	Biochemische Eigenschaften der exprimierten Phytasen aus <i>Arxula</i> und <i>E. coli</i>	23
2.2.	Kristallisation und Struktur der Phytase aus <i>Klebsiella</i>	25
2.2.1.	Die Kristallisation der <i>Klebsiella</i> -Phytase	25
2.2.1.1.	Erzeugung und Isolierung der <i>Klebsiella</i> -Phytasevarianten	25
2.2.1.2.	Kristallisationsbedingungen, Kristalle, Datensätze und Strukturlösung der <i>Klebsiella</i> -Phytase	26
	Die native, getaggte <i>Klebsiella</i> -Phytase und die Selenomethioninvariante	26
	Die inaktive Phytasemutante His25Ala (Kleb-M1)	27
2.2.2.	Die Struktur der <i>Klebsiella</i> -Phytase	30
2.2.3.	Modellierung der Substratbindung	32

2.3.	Mutagenesen der <i>Klebsiella</i> -Phytase	34
2.3.1.	Random-Punkt-Mutagenese (RP-Mutagenese) der Phytase	34
2.3.1.1.	Screening nach Phytasemutanten der RP-Mutagenesen.....	35
2.3.1.2.	Charakterisierung einiger RP-Mutanten	37
2.3.2.	Die Punktmutationsanalysen der <i>Klebsiella</i> -Phytase	42
2.3.2.1.	Charakterisierung der Punktmutationen (PM)	43
	Die spezifischen Phytase-und Phosphataseaktivitäten der PM-Mutanten	43
	Die Temperatur-und pH-Profile einiger PM-Mutanten	46
	Die Km-und Kcat-Werte der PM-Mutanten PM12, PM15, PM17 und PM22.....	48
2.4.	HPIC Analysen der Substratabbauprodukte und Phosphatfreisetzung durch die <i>Klebsiella</i> -Phytase und durch die Mutanten (PM).....	49
2.5.	Die Glukose-1-Phosphatase (AgpE) aus <i>Enterobacter cloacae</i>	54
2.5.1.	Die Sequenz der AgpE aus <i>Enterobacter cloacae</i> und der Vergleich zur Glukose-1-Phosphatase aus <i>E. coli</i> Agp	54
2.5.2.	Reinigung und Charakterisierung der His-getaggten <i>Enterobacter</i> Glukose-1-Phosphatase (AgpE).....	55
2.5.2.1.	Reinigung und Größenbestimmung der AgpE.....	55
2.5.2.2.	Substratspezifität der AgpE	57
2.5.2.3.	pH- und Temperaturoptima der AgpE.....	58
2.5.2.4.	Thermostabilität und pH-Stabilität der AgpE.....	60
2.5.2.5.	Effektoren der AgpE	61
2.5.2.6.	Die Phytatabbauprodukte der AgpE	63
2.5.3.	Kristallisation der AgpE mit Phytat	64
2.5.4.	Die Struktur der AgpE und die Substratbindung	66
2.5.4.1.	Die Struktur.....	66
2.5.4.2.	Elektronendichten der Phytat-und <i>myo</i> -Inositolhexasulfat-Bindung	67
2.5.4.3.	Die Konformationsänderung und H-Brückenausbildung bei Phytatbindung.....	68
2.5.5.	Überprüfung der Substratbindung der inaktiven Glukose-1-Phosphatase aus <i>Enterobacter</i> durch ITC-Messungen	71
2.5.6.	Mutationsanalysen der Phosphatase	72
	Substitutionen im AgpE- Molekül.....	72
2.5.6.1.	Die spezifischen Aktivitäten der Glukose-1-Phosphatasemutanten (AgpE-Mutanten)	73

2.5.6.2.	HPIC-Analysen der AgpE und der PMG-Mutanten.....	74
	Analysen der generierten Inositolphosphate nach AppA-Vorinkubation durch die AgpE und PMG-IX-Mutante.....	76
2.6.	Weitere HPIC-Analysen der Inositolphosphat-Generierung durch Phytasen	79
2.6.1.	Analysen der Phytatabbauprodukte durch die PM22-Phytasemutante in Kombination mit AppA.....	79
2.6.2.	Analysen der Abbauprodukte durch die PM22-Phytasemutante nach AppA-Vorinkubation.....	81
3.	Diskussion	
3.1.	Die Phytase aus <i>Klebsiella pneumoniae</i>	85
3.1.1.	Einfluss des His-Tags auf die biochemischen Eigenschaften der <i>Klebsiella</i> -Phytase.....	85
3.1.2.	Struktureller Vergleich der <i>Klebsiella</i> -Phytase mit anderen sauren Histidinphosphatasen	86
3.1.3.	Vergleich mit der <i>E. coli</i> -Phytase.....	89
3.1.3.1.	Das aktive Zentrum.....	89
3.1.3.2.	Die veränderte Phytatbindung in der <i>Klebsiella</i> -Phytase.....	90
3.1.3.3.	Die Abbauwege der Phytasen aus <i>Klebsiella</i> und <i>E. coli</i>	92
3.1.4.	Die Bedeutung des H-Brückennetzwerkes für die Aktivität der <i>Klebsiella</i> -Phytase.....	93
3.1.4.1.	Die Substratfixierung	93
	Gly26, Ile27 und Pro29.....	93
	Ala32, Gly33, Asn34.....	93
	Asn209	94
	Ser96	94
	Tyr249	95
	Einbau positiver AS-Reste	95
	Zusammenfassung.....	95
3.1.4.2.	Der Zugang zum aktiven Zentrum der <i>Klebsiella</i> -Phytase vermittelt eine Aktivitätserhöhung.....	96
	Lys198	96
	Arg262, Asp134 und Lys135.....	96
	Bedeutung des Randbereiches des aktiven Zentrums	97
3.1.5.	Die Anwendung der <i>Klebsiella</i> -Phytase in der Tierernährung.....	98
3.1.6.	Modell des Reaktionsmechanismus	99
3.2.	Die Glukose-1-Phosphatase AgpE aus <i>Enterobacter</i>	100
3.2.1.	Biochemische Eigenschaften der AgpE	100

3.2.2.	Struktureller Vergleich mit den <i>E. coli</i> -Enzymen Agp und AppA	102
3.2.3.	Phytatbindung und Hydrolyse	104
3.2.3.1.	Vergleich der Phytatbindungen der AgpE und der AppA.....	105
3.2.4.	Mutationsanalysen und der weitere Abbau des Phytats durch die AgpE-Mutanten	106
4.	Material	
4.1.	Primer und Oligonukleotide	111
4.2.	Plasmide	111
4.3.	Stämme	112
4.4.	Chemikalien und Reagenzien	114
4.5.	Puffer und Lösungen	115
4.6.	Medien	116
4.7.	Antibiotika	116
4.8.	Enzyme und andere Proteine	116
4.9.	Enzymsubstrate	117
4.10.	Sonstiges	118
4.11.	Geräte, Chromatographie-Säulen und Materialien	118
4.12.	Verwendete Software	120
5.	Methoden	
5.1.	Mikrobiologische Methoden	121
5.1.1.	Stammhaltung	121
5.1.2.	Kultivierung von Mikroorganismen	121
5.1.2.1.	Herstellung Ca ²⁺ -kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	121
5.1.2.2.	Transformation Ca ²⁺ -kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	121
5.1.2.3.	Proteinexpression	121
	Inkorporation von Selenomethionin	122
5.1.2.4.	Kultivierung der <i>Arxula</i> - Hefestämme und die konstitutive Proteinexpression	123
5.1.3.	Screening nach Phytase-Mutanten	123
5.2.	Genetische Methoden.....	123
5.2.1.	DNA-Fällung	123
5.2.1.1.	Ethanol-fällung	123
5.2.1.2.	Natriumacetat/Ethanol-fällung von DNA	124
5.2.2.	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Klebsiella sp. ASR1</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> und <i>Escherichia Coli</i> K12	124
5.2.3.	Plasmidpräparationen	125

5.2.3.1. Mini-Plasmidpräparation	125
5.2.3.2. Spin-Plasmidpräparation	125
5.2.3.3. Midi-Plamidpräparationen	125
5.2.4. Reinigung von Nukleinsäuren	125
5.2.4.1. Extraktion aus dem Agarose-Gel	125
5.2.5. Bestimmung der Quantität und Qualität von Nucleinsäuren (DNA)	125
5.2.6. DNA Restriktionen	126
5.2.7. Dephosphorylierung von DNA	126
5.2.8. Ligation von DNA	126
5.2.9. Amplifikationen („polymerase chain reaction“ (PCR))	126
5.2.9.1. Standard-PCR	126
5.2.9.2. SOE (splicing by overlap extension)–PCR	127
5.2.10. Konstruktion von Plasmiden	127
Konstruktion der Klebsiella-Phytase-Expressionsplasmide	127
Konstruktion der E. coli-Phytase-Expressionsplasmide	128
Konstruktion der Glukose-1-Phosphat-Expressionsplasmide	128
Konstruktion des Hefeexpressionsplasmids	128
5.2.10.1. Site-Directed Mutagenese	129
5.2.10.2. Mutagenese mittels SOE-PCR	129
5.3. Erzeugung der BL21- <i>appA</i> Deletionsmutante BL21-1T	129
5.4. Biochemische Methoden	129
5.4.1. Elektrophorese	129
5.4.1.1. Analytische und Präparative DNA-Agarosegel-Elektrophorese	129
5.4.1.2. SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese)	130
Coomassie-Färbung	130
Silber-Färbung	131
5.4.2. Western Blot	131
5.4.3. Bestimmung des Isoelektrischen Punktes im IEF Gel	131
5.4.4. Proteinreinigung	132
5.4.4.1. Zellaufschluss	132
Zellaufschluss mit Ultraschall	132
Zellaufschluss mit Lysozym und Tauen sowie Frieren	132
5.4.4.2. Vorbereitung der Hefe-Proteinproben für die FPLC	132
5.4.4.3. Konzentrieren und Dialyse von Proteinlösungen	133
Ammoniumsulfatfällung	133
Dialyse	133
5.4.4.4. FPLC-Reinigung (CM Sepharose™ FF)	133

5.4.4.5. Reinigung His-getaggtter Proteine über die FPLC (HiTrap Chelating HP Säule)	133
5.4.4.6. Proteinreinigung mittels Qiagen Ni ²⁺ -Agarose	134
5.4.4.7. Gelfiltration mittels FPLC	134
Proteinreinigung durch Gelfiltration (präparativ)	134
Bestimmung der molekularen Proteingrösse mittels Gelfiltration (analytisch)	135
5.4.5. Trichloressigsäure-Fällung (DOC-TCA-Fällung)	135
5.4.6. Enzymassays	136
5.4.6.1. Bestimmung von freiem Phosphat und der Standard-Phytase-aktivitätstest	136
Bestimmung von freiem Phosphat	136
Der Standard-Phytaseaktivitätstest	136
Variationen des Phytaseaktivitätstests	137
5.4.6.2. Allgemeiner Phosphataseaktivitätstest (pNPP)	137
5.4.6.3. Nachweis der Glykosylierung von Proteinen im Polyacrylamidgelen	137
5.4.7. Proteinbestimmung	138
5.4.7.1. Bestimmung nach Bradford	138
5.4.7.2. UV-Proteinbestimmung bei 280 nm	138
5.4.8. Identifikation der Phytat- und InsP-Abbauprodukte mittels HPIC-Analysen	138
5.4.8.1. Reaktionsansätze für den Substratabbau von Phytasen und Glukose-1-Phosphatasen	138
5.4.8.2. Durchführung der <i>myo</i> -Inositolphosphatanalysen	140
5.4.9. Ermittlung der proteinspezifischen Parameter	140
5.4.9.1. Temperaturoptimum und Temperaturstabilität	140
5.4.9.2. pH-Optimum und pH-Stabilität	140
5.4.9.3. <i>K_m</i> -Wert, <i>k_{cat}</i> , <i>V_{max}</i> - Bestimmung	141
5.4.9.4. Substratspezifität	141
5.4.9.5. Isotherme Titrations-Calorimetrie (ITC) der Glukose-1-Phosphatase-mutante	141
5.5. Kristallographische Arbeiten	142
5.5.1. Probenvorbereitung der <i>Klebsiella</i> -Phytase	142
5.5.2. Probenvorbereitung der Glukose-1-Phosphatasemutante	142
5.5.3. Kristallisation in 96-Well-Platten	142
5.5.4. Kristallisation in 24-Well-Platten	143
5.5.5. Kristallisation im „Microbatch“ unter Öl	143

6.	Referenzen	145
7.	Anhang	
7.1.	Sequenzverweise des Phylogramms	153
7.2.	Proteinalignment der sauren Histidinphosphatasen	154
7.3.	Plasmidkarten	155
7.4.	FPLC- und HPIC-Programme	158
7.4.1.	FPLC-Programme und das Elutionsprofil	158
7.4.2.	Programm der HPIC-Analysen	159
7.4.3.	Kalibrierung der HPIC	160

1. Einleitung

Phosphate bzw. Phosphatreste spielen in biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Sie sind essentiell für den Aufbau von wichtigen biologischen Molekülen und werden für den Energiestoffwechsel des Organismus benötigt. Die Limitation der Phosphatressourcen stellt ein Problem für die Phosphatversorgung der Organismen dar. Für die Ernährung von Mensch und Tier ist eine gute Phosphatversorgung von großer Bedeutung. Besonders in der Massentierhaltung ist eine effiziente Phosphatnutzung notwendig. In den Futterpflanzen und deren Samen ist Phosphat ein Hauptbestandteil. In typischen Futterpflanzen ist bis zu 80% des Phosphats in Form von Phytinsäure oder Phytat gebunden. Die Mobilisierung des Phosphates aus dem pflanzlichen Phosphatspeicher ist dabei von wesentlicher Bedeutung. Die Problematik der ungenügenden Phosphatmobilisierung aus Polyphosphatverbindungen der Pflanze durch Mensch und Tier ist lange bekannt. Aus diesem Grund wird nach Möglichkeiten einer besseren Phosphatfreisetzung gesucht. Vor allem wird in der Grundlagenforschung der Biologie und in der Biotechnologie nach Ansätzen zur Lösung des Problems geforscht.

1.1. Das Phytat und die Inositolphosphate

1.1.1. Struktur und Eigenschaften der Phytinsäure

Die Phytinsäure, auch als D-*myo*-Inositol-(1,2,3,4,5,6)-hexakisphosphat bezeichnet, besteht aus einem D-*myo*-Inositolring, an dem sechs Phosphatreste über Esterbindungen an die Kohlenstoffatome des Inositolrings gebunden sind. Die Phosphatreste sind dabei nicht untereinander verknüpft (Johnson & Tate, 1969). Der Inositolring der Phytinsäure nimmt in der Natur am häufigsten die *myo*-Form ein. In dieser thermostabilsten Sesselform liegen fünf der OH-Gruppen bzw. die Phosphatgruppen in der Phytinsäure in equatorialer Position und ein Rest in der axialen Position (Abbildung 1a). Die Symmetrieebene in der *myo*-Konformation verläuft dabei durch die C2- und C5-Atome des Rings (Bohn, Meyer & Rasmussen, 2008). Es existieren zwei prochirale Kohlenstoffatompaare C1/C3 und C4/C6. Die Konformation wird als sogenannte „Angranoﬀsche Schildkröte“ (Agranoff, 1978) bezeichnet (Abbildung 1b). Die Nummerierung der C-Atome des D-*myo*-Inositolrings erfolgt nach den Bestimmungen des „International Union of Pure and Applied Chemistry“ und dem „Nomenclature Committee of International Union of Biochemistry“ (IUPAC-IUB, 1969) in der D-Konformation immer entgegen dem Uhrzeigersinn, ausgehend von dem „rechten Bein der Schildkröte“

(Shears, 2004). Der axiale Phosphatrest ist in der *myo*-Konformation der Phytinsäure stets über die Esterbindung am C2-Atom des Inositolrings gebunden (Abbildung 1c).

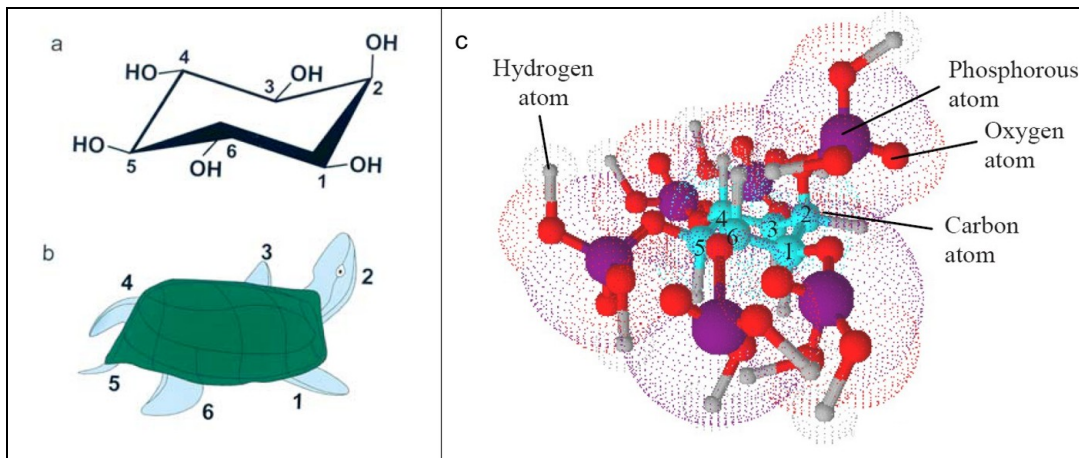


Abbildung 1: Nomenklatur und Struktur der Phytinsäure (Shears, 2004). Die Phytinsäure nimmt in dem pH-Bereich von pH 0,5 bis pH 10,5 die stabile *myo*-Form ein (a). Diese Form wird als „Angerhoffsche Schildkröte“ bezeichnet, wobei der axiale Phosphatrest am C2-Atom gebunden ist (c). Die Phosphatreste werden im D-*myo*-Form ausgehend von dem „rechten Bein“ entgegen dem Uhrzeigersinn numeriert (b) (Bohn *et al.*, 2008).

Diese *myo*-Konformation der Phytinsäure wird nahezu im gesamten pH-Bereich von pH von 0,5 bis 10,5 eingenommen. Bei pH-Werten über pH 10,5 ändert sich die Konformation in eine äquatoriale Phosphatgruppe und fünf axiale Phosphatgruppen (Bohn *et al.*, 2008). Die Phosphatgruppen der Phytinsäure können zwölf Protonen binden. Die *pKa*-Werte der Phosphatgruppen sind von der Ionenstärke und der Temperatur abhängig und reichen von 1,1 bis 10,0 (Costello, Glonek & Myers, 1976; Torres *et al.*, 2005).

Die Phytinsäure kommt in der Natur oft als Anion vor und kann Kationen komplexieren. Phytinsäure ist ein starker Chelatbildner. Das Anion, welches mit Metall-Ionen teilweise unlösliche Produkte bildet, wird als Phytat bezeichnet (Torres *et al.*, 2005). Die Stöchiometrie zwischen der Anzahl der Ionen und einem Phytinsäuremolekül beeinflusst die Löslichkeit des Phytates (Bullock J. I. *et al.*, 1995; Nolan, Duffin & Mcweeny, 1987). Die Komplexbildung ist ebenso pH-abhängig und wird zudem von der Konzentration der Kationen bestimmt (Oh *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2005). Bei niedrigen pH-Werten sind die Phosphatgruppen des Phytats protoniert, daher liegt in diesem Fall die metallfreie Form vor. Bei neutralen pH-Werten wird die Komplexbildung durch die Deprotonierung der Phosphatgruppen begünstigt (Abbildung 2A). Es steigt die Affinität zu bivalenten Kationen, wie Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} sowie Cu^{2+} und es wird das Metall-Phytat gebildet (Bohn *et al.*, 2007; Maenz *et al.*, 1999). Der Ionenradius der Kationen bedingt die Art der Komplexbildung. Größere Ionen, wie Ca^{2+} , binden an zwei Phosphatgruppen und Ionen mit einem kleinen Ionenradius (Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}) binden nur an einem Phosphatrest (Abbildung 2B) (Cheryan, 1980; Martin & Evans, 1986).

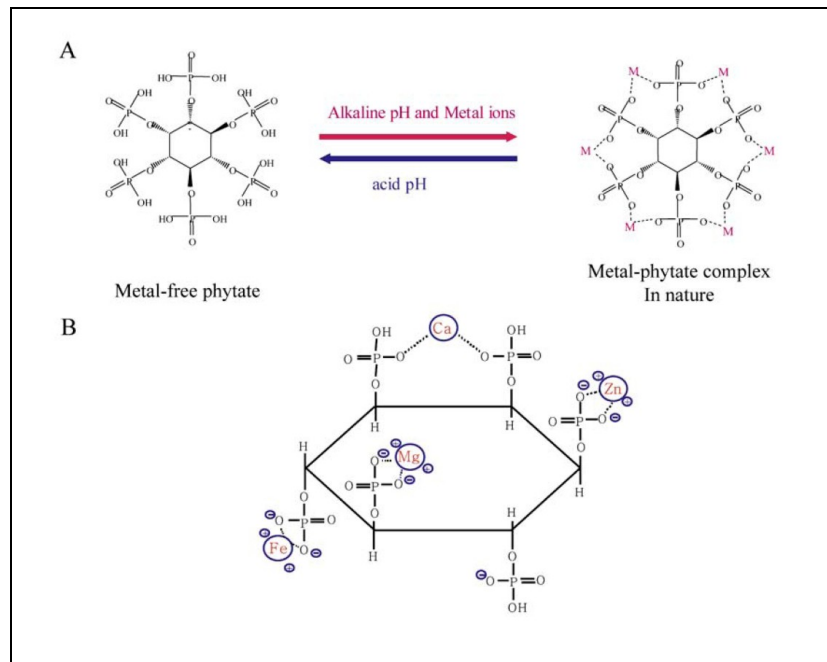


Abbildung 2: Komplexbildung der Phytinsäure nach Oh et al. 2004. Die Komplexbildung der Phytinsäure ist stark pH-abhängig. Die metallfreie Form liegt bei einem sauren pH vor. Im alkalischen Milieu werden meist zweiwertige Kationen komplexiert und so das Metall-Phytat gebildet. Die Komplexbildung ist neben dem pH von der Größe der Kationen abhängig. Ionen mit einem großen Ionenradius können mit zwei Phosphatresten der Phytinsäure komplexieren. Kleinere Ionen komplexieren nur an einem Phosphatrest.

1.1.2. Vorkommen und Bedeutung von Inositolphosphaten

Die Phytinsäure wird in Pflanzen während der Samenentwicklung gebildet. In Getreidesamen, Nuss- und Ölsamen sowie in Samen von Leguminosen sind ca. 60 – 90 % des Gesamtphosphates in Form von Phytinsäure gebunden (Lott et al., 2000; Lott et al., 2001). Die primäre Funktion der Phytinsäure liegt demnach in der Phosphatspeicherung als Energieressource und als Antioxidanz während der Samenkeimung (Raboy, 2003). Das Salz der Phytinsäure, Phytat, ist auch als Speicher von Mineralien in Samen von Bedeutung. Phytat ist in der Aleuronschicht, einer eiweißhaltigen Schicht, oder in Samenembryonen in proteinhaltigen Vakuolen gespeichert. Phytinsäure wurde aber auch in unterschiedlichen eukaryotischen Geweben entdeckt. So kann Phytinsäure adhärent über Phosphoinositide gebunden oder mit Proteinen und Ionen komplexiert vorliegen (Torres et al., 2005). Die Phytinsäure ist generell bei Eukaryoten in eine Vielzahl von metabolischen Prozessen eingebunden. Die Phytinsäure spielt als Chelatbildner, Phosphatdonor und Phosphatakzeptor eine wichtige Rolle (Bohn et al., 2008). Einige niedrige Inositolphosphate sind in die Stressantwort, in Membranbiosynthesen und in intrazelluläre Signalprozesse involviert (Loewus & Murthy, 2000; Storcksdieck genannt Bonsmann & Hurrell, 2007). Einige Inositoltriphosphate, wie D-myo-Ins(1,4,5)P₃, sind Bestandteile von Signalkaskaden. Sie dienen als sekundäre Messenger (Berridge & Irvine, 1989) und unterstützen die Proteinfaltung (Macbeth et al.,

2005). Die Phytinsäure kann ebenfalls als Precursor von Komponenten dienen, die in zahlreiche Zellsignaltransduktionsprozesse eingreifen. Phytinsäure, Phytat und andere *myo*-Inositolphosphate sind auch in tierischen Organismen in zahlreiche Prozesse eingebunden. So ist die Phytinsäure bei der Stärkeverdauung sowie bei der Blutglukoseantwort (Lee *et al.*, 2006) beteiligt und soll zur Verringerung von Cholesterol und Triglyceriden führen (Jariwalla, 1999; Onomi, Okazaki & Katayama, 2004). Weiterhin soll die Bildung von Nierensteinen durch Inositolphosphate verhindert werden (Grases *et al.*, 1998). Auf zellulärer Ebene sind Inositolphosphate in die Genregulation, in den mRNA Export und die DNA-Reparatur involviert (York, 2006; York *et al.*, 1999). Phytat und *myo*-Inositolpentakisphosphate wirken bei der Neurotransmission (Sasakawa *et al.*, 1993; Sasakawa *et al.*, 1992; Sasakawa, Sharif & Hanley, 1995) sowie bei Endo- und Exocytoseprozessen (Efanov, Zaitsev & Berggren, 1997). Für Inositolphosphate wurde eine unterstützende Funktion bei Zellteilungsprozessen und bei der Zelldifferenzierung beschrieben (Berridge & Irvine, 1989). Daher wird auch eine Wirkung als Antikarzinogen diskutiert (Jariwalla, 1992; Vucenik & Shamsuddin, 2006).

1.2. Bedeutung von phytatspaltenden Enzymen

Der menschliche und tierische Organismus ist nicht in der Lage Phosphat aus der Phytinsäure oder dem Phytat zu mobilisieren (Common, 1989). Diese Polyphosphatverbindungen der Pflanze können durch Fehlen spezifischer Enzyme im Magen-Darm-Trakt monogastrischer Tiere nicht abgebaut werden. Sie werden unverändert ausgeschieden. Damit ist das phytatgebundene Phosphat nicht nutzbar, was in der Massentierhaltung eine Anreicherung des Futters mit anorganischem Phosphat notwendig macht. Langfristig führt dies, bedingt durch die Massentierhaltung, zu einer Anreicherung der Phytinsäure in Böden und im Grundwasser. Dort kommt es zur Komplexierung von Metall-Ionen und damit zu einer Verarmung der Böden an Mineralien. Im Grundwasser können Bakterien Phosphat freisetzen und damit zur Eutrophierung beitragen (Pen *et al.*, 1993; Yanke *et al.*, 1998).

Um das Phosphat aus den Verbindungen zu mobilisieren und die Folgen der Anreicherung zu verhindern, wird seit Jahren nach Enzymen, den sogenannten Phytasen, in Bakterien, Pflanzen, Hefen und Pilzen gesucht, die unter optimalen pH- und Temperaturbedingungen effizient Phosphat aus der Phytinsäure oder Phytat abspalten. Durch diese Phytasen soll das Phosphat für die Tiere nutzbar gemacht werden. Das Haupteinsatzgebiet der Phytasen liegt also in der Tierernährung. Es wurden drei Strategien entwickelt, um die Phytasen für die Tierernährung zu nutzen. Heute sind bereits zahlreiche Produkte auf dem Markt, die den Anforderungen der effizienten Phosphatfreisetzung aus Phytat gerecht werden sollen. Durch Beifügen zum Futter wird

die Phytinsäurespaltung eingeleitet und im Magen-Darm-Trakt bewerkstelligt. Produkte wie Natuphos™ (BASF), OptiPhos® (Phytex), Quantum™ (Diversa/Syngenta) und Phyzyme™ (Diversa/Danisco) werden in der Tierernährung genutzt. So kann die Menge an zugesetztem anorganischem Phosphat zum Futter verringert werden, das nicht nur zu einer Kostenreduzierung sondern auch zu einer Minimierung der zuvor beschriebenen Effekte der Phytatanreicherung führt. Eine weitere Strategie ist die Erzeugung von transgenen Tieren, wie zum Beispiel an Mäusen und Schweinen (Golovan *et al.*, 2001a; Golovan *et al.*, 2001b) demonstriert wurde. Mit dem Speichel des Tieres wird eine bakterielle Phytase gebildet. Diese kann bereits direkt bei Nahrungsaufnahme des Tieres wirken. Die Erzeugung von transgenen Pflanzen (Bilyeu *et al.*, 2008), in denen ebenfalls oft bakterielle Phytasen zusätzlich exprimiert werden, sollen das phytatgebundene Phosphat verfügbar machen und den Phytatgehalt, z.B. in Korn, reduzieren (Spencer, Allee & Sauber, 2000a; Spencer, Allee & Sauber, 2000b).

Es ist erwiesen, dass durch Phytat wertvolle Kationen und Aminosäuren komplexiert werden. Dies kann bei einseitiger und phytatreicher Ernährung, z.B. auf Grundlage von Hülsenfrüchten, zu einer Minderversorgung führen (Torre, Rodriguez & Saura-Calixto, 1991). Neben der Phosphatfreisetzung bewirken Phytasen deshalb eine bessere Versorgung des tierischen Organismus mit Mineralien und wichtigen Aminosäuren (Broz *et al.*, 1994; Sandberg, Hulthen & Turk, 1996).

Die Erzeugung von bestimmten Inositolphosphaten, wie D-Ins(1,4,5)P₃, die beispielsweise als Neurotransmitter dienen (Sasakawa *et al.*, 1995) oder bei der Krebstherapie eingesetzt werden können (Vucenik & Shamsuddin, 2006), ist von großem Interesse für die Pharmazeutische Industrie. Zukünftig könnten einige dieser Inositolphosphate durch die Verwendung von Phytasen kostengünstiger erzeugt werden.

1.3. Phytasen

Phytasen sind Phosphomonoester-Hydrolasen die *ortho*-Phosphat vom *myo*-Inositol(1,2,3,4,5,6,)-hexakisphosphat (Phytinsäure) oder vom Salz der Phytinsäure, dem Phytat, hydrolytisch abspalten.

Die Phytasen werden der großen Gruppe der Phosphatasen, auch Hydrolasen (E.C. 3) genannt, zugeordnet. Des Weiteren werden sie als Phosphomonoester-Hydrolasen (E.C.3.1.3) bezeichnet, da sie *ortho*-Phosphat aus Phosphomonoester-Verbindungen freisetzen können. Die Phosphomonoester-Hydrolasen werden außerdem nach ihren biochemischen Eigenschaften, wie z.B. nach dem pH-Optimum der hydrolytischen *ortho*-Phosphatabspaltung und nach der Substratspezifität, unterteilt (Vincent, Crowder & Averill, 1992a). Daher erfolgt nach dem Nomenklaturkomitee (NC-IUBMB), z.B. eine Einteilung der Phosphomonoester-Hydrolasen in alkalische (E.C. 3.1.3.1), saure

Phosphatasen (E.C. 3.1.3.2), Phytasen (E.C. 3.1.3.8/26/72), Glukose-1-Phosphatasen (E.C. 3.1.3.10) und andere Enzyme (E.C. 3.1.3.X), die spezielle Phosphoresterverbindungen hydrolysieren können.

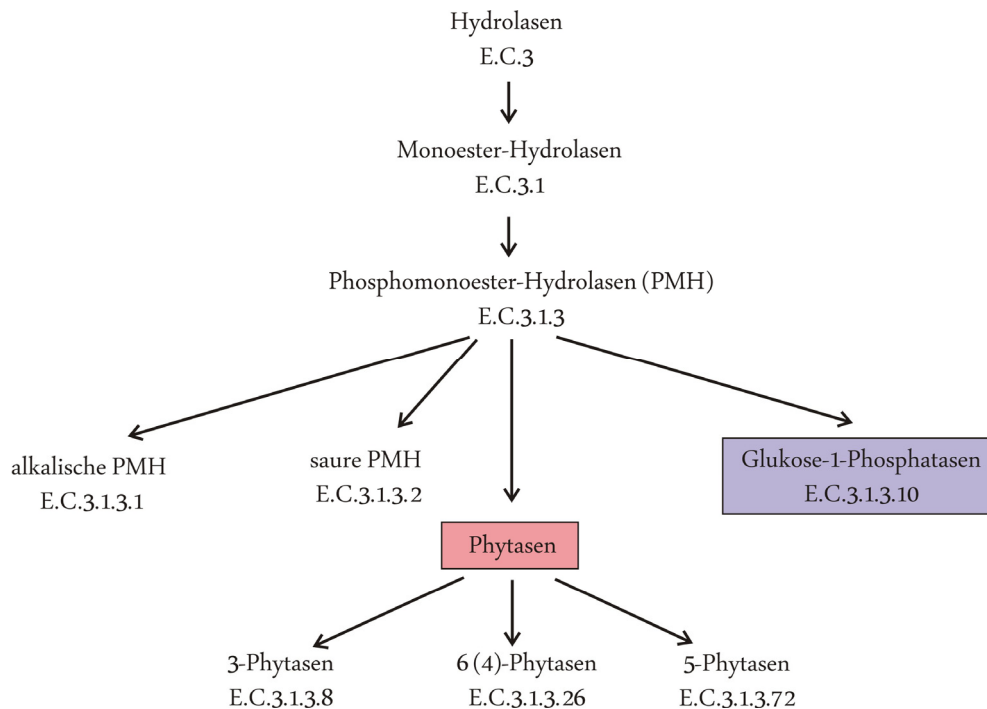


Abbildung 3: Einordnung der Phytasen und Glukose-1-Phosphatasen nach der NC-IUBMB und IUPAC-IUBMB

Basierend auf der Position der Kohlenstoffatome des *myo*-Inositolrings des Phytats an dem der erste Phosphatrest abgespalten wird, werden die Phytase unterschieden. Nach der IUPAC-IUBMB werden Phytasen in 3-Phytasen (E.C.3.1.3.8), 6-Phytasen (E.C.3.1.3.26) und 5-Phytasen (E.C.3.1.3.72) unterteilt. Zusätzlich erfolgt eine Einteilung der Phytasen nach dem pH-Optimum der Katalyse in saure und alkalische Phytasen.

Phytasen sind in der Natur weit verbreitet und sind in Mikroorganismen, Pflanzen und tierischen Geweben zu finden (Van Etten *et al.*, 1991). Phytaseaktivitäten sind häufig in Pilzen, wie *Aspergillus niger*, *Aspergillus ficcum* (Shieh & Ware, 1968; Ullah & Gibson, 1987), gram-positiven Bakterien, wie *Bacillus* (Kerovuo *et al.*, 1998) und gram-negativen Bakterien, wie *E. coli* (R.Greiner, 1993), *Citrobacter* (Kim *et al.*, 2003), *Klebsiella* (Greiner *et al.*, 1997; Sajidan *et al.*, 2004) zu finden. Die Phytasen der gram-negativen Bakterien sind periplasmatische Enzyme. Die mikrobiellen Phytasen der gram-positiven Bakterien und Pilze sind extrazelluläre Enzyme und werden sekretiert. Die Pilz- und bakteriellen Phytasen gehören hauptsächlich zu der Gruppe der 3-Phytasen und beinhalten sowohl saure als auch alkalische Phytasen.

Pflanzliche Phytasen sind vorrangig 6-Phytasen mit einem pH-Optimum im leicht sauren pH. Phytasen wurden in Weizen (Nakano *et al.*, 2000), Gerste (Greiner, Jany & Larsson

Alminger, 2000), Reis (Hayakawa, Toma & Igaue, 1989), Tomatenwurzeln (Li *et al.*, 1997) und anderen Pflanzen entdeckt und charakterisiert. Ein Vertreter der pflanzlichen Phytasen aus Lilien-Pollen ist eine alkalische Phytase, die auch den 5-Phytasen zugeordnet werden kann (Jog *et al.*, 2005). In tierischen Geweben sind ebenfalls Phytasen zu finden. Eine Phosphatase aus Vogelzellen, genannt „multiple inositol polyphosphate phosphatase“ (MINPP), zeigt geringe Phytaseaktivitäten (Cho *et al.*, 2006). Die verschiedenen Phytasen unterscheiden sich stark in ihren Strukturen und biochemischen Eigenschaften. Darüber hinaus zeigen sie deutliche Unterschiede in den Phytatabbauwegen. Die Generierung der verschiedenen *myo*-Inositolphosphate durch die Phytasen ist für jedes Enzym spezifisch. Die Produkte des Phytatabbaus dienen auch als Substrate für andere Enzyme (Konietzny & Greiner, 2002).

Strukturell werden vier Gruppen von Phytasen unterschieden (Mullaney & Ullah, 2003; Puhl *et al.*, 2007; Yanke *et al.*, 1998). Dazu zählen die β -Propeller-Phytasen (Kerovuo, Lappalainen & Reinikainen, 2000; Kim *et al.*, 1998), die sauren Purpurphosphatasen (PAPs) (Beck *et al.*, 1999; Hegeman & Grabau, 2001), eine Cystein-Phytase, die *myo*-Inositolpolyphosphatase aus *Selenomonas ruminantium* (IPPase) (Chu *et al.*, 2004; Yanke *et al.*, 1998) und die sauren Histidinphosphatasen (HAPs) (Cottrill *et al.*, 2002; Greiner, Konietzny & Jany, 1993).

1.3.1. Die β -Propeller-Phytasen

Die β -Propeller-Phytasen besitzen keinerlei Ähnlichkeiten zu den anderen drei Phytasentypen. Sie grenzen sich hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften und auch strukturell stark ab. Sie werden den alkalischen Phytasen zugeordnet, d.h. sie hydrolysieren die Phosphatreste des Phytats im neutralen bis alkalischen Milieu. Sie besitzen ihr Temperaturoptimum zwischen 60 °C und 70 °C und sind bis 80 – 95 °C thermostabil (Kim *et al.*, 1998; Tye *et al.*, 2002). Vertreter der β -Propeller-Phytasen sind in Bakterien, wie *Bacillus sp.* und *Shewanella oneidensis* (Cheng & Lim, 2006; Kerovuo *et al.*, 1998), sowie in Pflanzensamen zu finden (Hara *et al.*, 1985).

Die hohe Thermostabilität, das pH-Optimum sowie und die ausgeprägte Substratspezifität für Phytat macht diese Phytasen für biotechnologische Anwendungen bedeutsam.

Die Struktur dieser Phytasen ähnelt, wie der Name schon sagt, einem Propeller mit sechs Blättern (Ha *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2001). Jedes der Schneidenblätter besteht aus vier bis fünf antiparallel verlaufenden β -Faltblättern, die jeweils untereinander in topologisch identischer Weise verbunden sind. Dabei ist das erste Faltblatt der Schneide mit dem letzten Faltblatt der nächsten Schneide verbunden (Shin *et al.*, 2001).

Die β -Propeller-Phytasen besitzen zwei Phosphatbindungsstellen und sind kalziumabhängig. Es werden sechs bis sieben Kalzium-Ionen im Molekül gebunden. Drei

hochaffine Bindungsstellen, Ca1 - Ca3, bewirken die Thermostabilität. Drei weitere Bindungsstellen, Ca4 - Ca6, vermitteln die katalytische Aktivität (Ha *et al.*, 2000; Kerovuo, Rouvinen & Hatzack, 2000). Weiterhin sind Kalzium-Ionen mit dem Phytat komplexiert oder zusätzlich im Molekül gebunden. Diese sind für die Substratspezifität von Bedeutung (Oh *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2001). Die katalytische Spaltung der Phosphatreste erfolgt über einen nukleophilen Angriff auf den zu spaltenden Phosphatrest durch ein Hydroxid-Ion. Das Ca^{2+} -Phytat ist dabei in zwei Positionen, Pho1 und Pho2, gebunden. Die negative Ladung des Pho1-Restes, des zu spaltenden Restes, wird über vier Kalzium-Ionen abgedeckt. Zwei Glutaminreste sind an der Kalzium-Chelation beteiligt. Als Säure und damit als Protonendonator für die Freisetzung des Phosphatrestes dienen Wassermoleküle oder ein Lysinrest. Andere positiv geladene Reste, wie Lysin und Arginin, positionieren das Phytat im aktiven Zentrum (Shin *et al.*, 2001).

Die β -Propeller-Phytasen sind 3-Phytasen und bauen Phytat bis zum *myo*-Inositoltriphosphat ab. Im ersten Schritt wird der Phosphatrest vom C3-Atom des Ca^{2+} -Phytats hydrolytisch abgespalten. So entsteht ein D-*myo*-Ins(1,2,4,5,6)P₅. Nun werden alternierend zwei weitere Phosphatreste am C1-Atom (*myo*-Ins(2,4,5,6)P₄) und am C5-Atom des *myo*-Inositolrings abgespalten. Es entsteht ein *myo*-Ins(2,4,6)P₃-Produkt (Greiner *et al.*, 2007; Oh *et al.*, 2006).

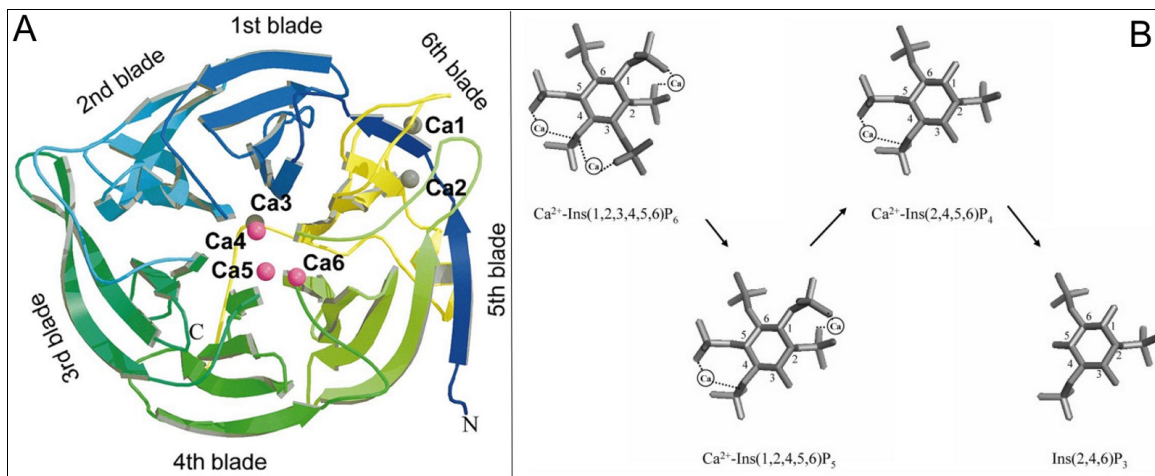


Abbildung 4: Struktur der β -Propeller-Phytase aus *Bacillus amyloliquefaciens* nach Ha *et al.* 2000 (A) und Phytatabbauweg durch die β -Propeller-Phytasen nach Oh *et al.* 2006 (B). Die β -Propeller-Phytase besteht aus sechs Schneiden (blau-gelb), die sich aus drei bis vier β -Faltblättern zusammensetzt. Die drei Kalzium-Ionen (Ca1 - Ca3-grau) vermitteln die Thermostabilität der Phytase und befinden sich in den Hochaffinitäts-Kalziumbindungsstellen. Die anderen drei Ionen (Ca4 - Ca6-margenta) bestimmen die Aktivität der Phytase und besetzen die Niedrigaffinitäts-Kalziumbindungsstellen. Der Abbau des Phytats ist stark kalziumabhängig. Bei neutralem pH sind drei Kalzium-Ionen an der Phytinsäure komplexiert (B). Schrittweise, ausgehend vom Phosphatrest des C3-Atoms des *myo*-Inositolrings erfolgt die hydrolytische Abspaltung der Phosphatreste am C1 und dann am C5-Atom. Für jede Abspaltung eines Phosphatrestes wird ein Kalzium-Ion, wahrscheinlich für die Bindung, benötigt. Das Endprodukt *myo*-Inositol(2,4,6)P₃ kann nicht weiter gespalten werden, da kein Kalzium mit diesem Inositolphosphat komplexieren kann.

1.3.2. Die sauren Purpurphosphatasen

Die sauren Purpurphosphatasen (PAPs) sind Metallohydrolasen mit zwei heterovalenten Metall-Ionen (Fe(III) und Fe(II) / Ni(II) / Mn (II) / Co(II)) im aktiven Zentrum. Sie sind in Pflanzen und tierischen Geweben zu finden und werden den 6-Phytasen zugeordnet. In einigen Mikroorganismen wurden PAP ähnliche Enzyme entdeckt (Schenk *et al.*, 2000a; Schenk *et al.*, 2000b; Vogel *et al.*, 2002). Die tierischen tartratresistenten PAPs (TPAPs) sind wahrscheinlich beim Eisentransport, bei der Generierung von reaktiven Sauerstoffverbindungen und bei der Knochenresorption von Bedeutung (Oddie *et al.*, 2000). Die pflanzlichen PAPs besitzen hauptsächlich Funktionen im Phosphatmetabolismus (Lung *et al.*, 2008). Die PAPs haben meist ein breites Substratspektrum und können kleine Phosphatverbindungen spalten. Allerdings sind nicht alle PAPs in der Lage Phytat zu spalten. Derzeit wurden Phytaseaktivitäten für die PAPs aus Sojabohnen (Hegeman & Grabau, 2001), aus Arabidopsis (Zhang *et al.*, 2008) und aus Tabakwurzeln (Lung *et al.*, 2008) beschrieben. Der Name der Purpurphosphatasen leitet sich von der Pink- bis Purpurfärbung ab, die in konzentrierten wässrigen Lösungen des Enzyms auftritt. Es tritt ein Ladungstransfer zwischen einem chromophoren Eisen-III-Ion und dem katalytischen Tyrosinrest auf (Vincent & Averill, 1990). Bei dem zweiten nicht chromophoren Metall-Ion handelt es sich bei Pflanzen um ein Zink(II) oder Mangan(II)-Ion und bei Tieren um ein weiteres Eisen(II)-Ion (Beck *et al.*, 1999; Bernhardt, Schenk & Wilson, 2004; Vogel *et al.*, 2002). Die beiden Metall-Ionen werden durch insgesamt sieben negativ geladene Aminosäurereste koordiniert.

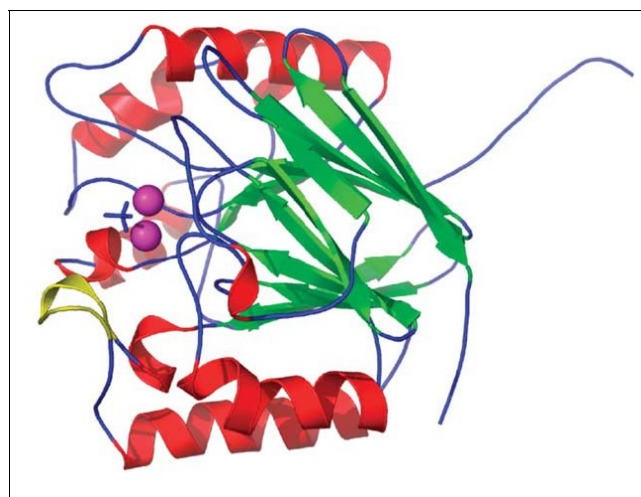


Abbildung 5: Die Struktur der humanen PAP nach Stäter *et al.* 2005. Das Molekül besitzt eine Symmetrieachse. Diese Achse läuft durch das Zentrum. Jede Hälfte besteht aus einem βαβα-Motiv, in dem ein β-Faltblatt, Hälfte des β-Sandwichs (grün), von α-Helices umgeben ist (rot). Die beiden Eisen-Ionen im aktiven Zentrum (magenta) bilden Brücken zwischen dem Phosphatrest und den Polypeptid-Loops (blau).

Die PAPs sind in einem pH-Bereich von 3,0-8,0 aktiv (Vincent, Crowder & Averill, 1992b). In Pflanzen sind zwei Formen der PAPs, die hochmolekulare und niedermolekulare Form, zu finden. Die hochmolekularen Formen sind Homodimere mit Molekulargewichten von ca. 110 kDa. Jede Untereinheit besteht aus einer N-terminalen- und C-terminalen Domäne. In der C-terminalen Domäne sind die zwei hetrovalenten Ionen (Fe(III) und Zn(II) / Mn(II)) lokalisiert (Schenk *et al.*, 2008). Die kleinen oder niedermolekularen Formen sind monomerisch und besitzen ein Molekulargewicht von ca. 35 kDa (del Pozo *et al.*, 1999; Schenk *et al.*, 2000a). Die tierischen PAPs besitzen ebenfalls ein Molekulargewicht von 35 kDa und ähneln in Sequenz und Struktur der pflanzlichen niedermolekularen Form (Flanagan *et al.*, 2006). Die Struktur der PAP-Phytasen ist jedoch nicht genau bekannt. Es werden anhand der DNA-Sequenzen größere strukturelle Ähnlichkeiten der PAP-Phytasen zu den tierischen PAP vermutet (Schenk *et al.*, 2000a; Strater *et al.*, 2005).

1.3.3. Die Inositolpolyphosphatase aus *Selenomonas ruminantium*

Bei der Inositolpolyphosphatase (IPase) aus *Selenomonas ruminantium* (PhyAsr) handelt es sich um eine bakterielle Phosphatase, die eine große Ähnlichkeit zur Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP) zeigt. Diese IPase hydrolysiert, im Gegensatz zur PTP, Phytat. Weiterhin kann das Enzym Phosphat von pNPP, Phosphotyrosin und Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat abspalten (Puhl *et al.*, 2007). Sie zeigt eine enge Verwandtschaft zu den PTPs. Die PTPs wurden zuvor in zahlreichen Prokaryoten und Eukaryoten entdeckt. In Prokaryoten ist derzeit eine genaue Funktion nicht bekannt, aber in eukaryotischen Zellen sind sie bei regulatorischen Prozessen der Zellfunktionen beteiligt (Shi, Potts & Kennelly, 1998).

Die Phytase (PhyAsr) besitzt weniger als 20 % Sequenzähnlichkeit zu den bekannten PTPs oder IPasen. Die Phytase besteht aus einer großen und einer kleinen Domäne. Das PhyAsr-Enzym besitzt ein PTP-ähnliches aktives Zentrum mit einem HCEAGVGR-Aminosäuremotiv und zwei Phytatbindungsstellen (Chu *et al.*, 2004). Dieses HC(X)₅R-Motiv, auch als P-Loop-Motiv bezeichnet, ist bei allen PTPs konserviert. Das HC(X)₅R-Motiv ist für deren Aktivität verantwortlich (Zhang *et al.*, 1998; Zhang, 2002; Zhang, 2003; Zhang, Wang & Dixon, 1994a). Die Dephosphorylierung erfolgt in einem Zweischrittmechanismus unter sauren Bedingungen. Der Cysteinrest des HC(X)₅R-Motives bildet während der Katalyse ein Phosphocystein-Zwischenprodukt (Cirri *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1994a; Zhang *et al.*, 1994b). Primäre Amine und die Aminogruppen des konservierten Argininrestes koordinieren den Phosphatrest im aktiven Zentrum und stabilisieren gleichzeitig die negative Ladung des Substrates (Zhang *et al.*, 1994b). Im nächsten Schritt wird der Phosphatrest unter Wirkung eines Asparagin-Restes und

Spaltung des Zwischenproduktes freigesetzt (Jia *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1994a; Zhang *et al.*, 1994b). Die Spaltung des Phytats erfolgt vorrangig zuerst durch Abspaltung des Phosphatrestes am C5-Atom des Substrates. Ein *myo*-Inositol(2)-Phosphat entsteht nach der schrittweisen Abspaltung der anderen Phosphatreste (Puhl, Greiner & Selinger, 2008).

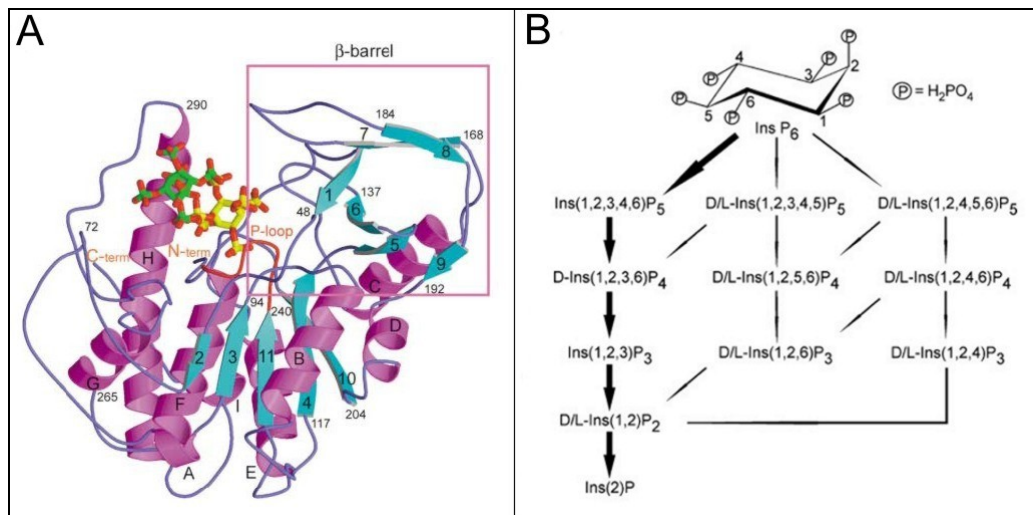


Abbildung 6: Die Struktur der PTP-ähnlichen Phytase aus *Selenomonas ruminantium* (A) nach Chu *et al.* 2004 und der Phytatabbauweg durch die Phytase (B) nach Puhl *et al.* 2008. Die Phytase besteht aus zwei Domänen, einer großen und einer kleinen (eingerahmt). Die Phytase besitzt zwei Phytatbindungsstellen im aktiven Zentrum. Mittels Kokristallisation, unter Verwendung des Inhibitors *myo*-Inositolhexasulfat, wurde eine „Standby“-Bindungsstelle (grün) und eine Inhibitor-Bindungsstelle (gelb) entdeckt. Die Standby-Bindungsstelle befindet sich etwas vom aktiven Zentrum entfernt. Die Phytase aus *Selenomonas ruminantium* spaltet schrittweise Phosphatreste vom Phytat bis zu einem *myo*-Inositolmonophosphat ab. Die initiale Abspaltung erfolgt vorrangig an der C3-Position des Phytats (dicke Pfeile). Jedoch konnten auch zwei alternative Abbauwege aufgezeigt werden. In einem dieser Wege erfolgt eine Abspaltung des Phosphatrestes an der C6-Position. Bei allen drei postulierten Abbauwegen wird das Produkt D/L-Ins(1,2)P₂ gebildet und durch Abspaltung des Phosphatrestes in der C1-Position dann das Endprodukt.

1.3.4. Die sauren Histidinphosphatasen

Unter den sauren Histidinphosphatasen (HAPs) sind Vertreter zu finden, die als 3- und 6-Phytasen bezeichnet werden. Allerdings besitzen nicht alle HAPs eine Phytaseaktivität. Die meisten bakteriellen Phytasen (Dassa *et al.*, 1982), Pilzphytasen (Wyss *et al.*, 1999b) und auch pflanzliche Phytasen (Maugenest *et al.*, 1999; Maugenest, Martinez & Lescure, 1997) gehören der Familie der sauren Histidinphosphatasen an (Van Etten *et al.*, 1991). Die sauren Histidinphosphatasen sind nach dem aktiven katalytischen Histidinrest und dem pH-Optimum der Hydrolyse der Phosphatesterverbindungen benannt. Die Vertreter der sauren Histidinphosphatasen, aus Pro- und Eukaryoten, weisen zwei konservierte Aminosäure-Motive, das RHG/NxRxP-Motiv und HD-Motiv, auf. Weiterhin ist auch ein anderer Argininrest ein wichtiger Bestandteil des aktiven Zentrums und ebenfalls für die Aktivität dieser Enzyme bestimmend (Ostanin *et al.*, 1992; Van Etten *et al.*, 1991). Die

mikrobiellen, phytatspaltenden Enzyme dieser Familie besitzen teilweise geringe Übereinstimmungen in den Aminosäuresequenzen und bilden fünf Untergruppen, wobei die *Xanthomonas*-Phytase auch als eine eigene Untergruppe angesehen werden könnte (Abbildung 7). Die Phytasen dieser Gruppen zeigen Unterschiede in der Substratspezifität sowie im pH- und Temperaturoptimum. Grundsätzlich spalten HAPs Phytat in der metallfreien Form und bei sauren pH-Werten. Einige HAPs zeigen ein breites Substratspektrum und spalten *ortho*-Phosphat aus Phytat mit geringerer spezifischer Aktivität. Sie hydrolysieren auch Phosphat aus anderen Phosphoesterverbindungen, wie z.B. Glukose- und Fruktose-Phosphaten, ATP, Nitrophenylphosphat und anderen Inositolphosphaten (Cottrill *et al.*, 2002; Mullaney & Ullah, 2003; Pradel & Boquet, 1988; Wyss *et al.*, 1999b). Andere besitzen nur eine sehr hohe spezifische Aktivität gegenüber Phytat und zeigen somit ein geringes Substratspektrum (Greiner *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu den β -Propeller-Phytasen besitzen alle HAPs eine geringe Thermostabilität. Bakterielle Vertreter zeigen Aktivitäten bis maximal 60 – 65 °C, dagegen besitzen die Pilzphytasen eine relativ hohe Restaktivität (bis zu 40 %) über 65 °C. (Liu *et al.*, 1998; Wyss *et al.*, 1999b).

Phylogram

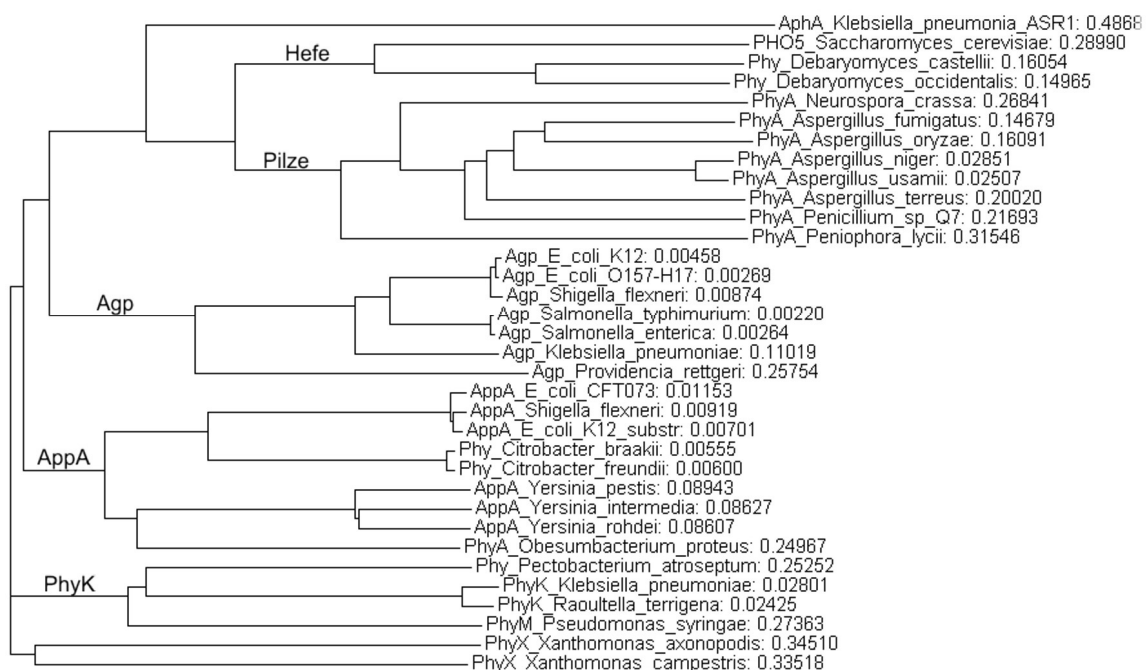


Abbildung 7: Das Phylogramm der mikrobiellen sauren Histidinphosphatasen mit Phytaseaktivität wurde mit dem Alignmentprogramm ClustalW2 erzeugt. Als Bezug wurde die saure Phosphatase AphA aus *Klebsiella pneumoniae* ASR1 herangezogen. Agp: Glukose-1-Phosphatasen, AppA: *E. coli*-Phytase, PhyK: *Klebsiella*-Phytase. Sequenzenverweise siehe Anhang.

1.3.4.1. Struktur und molekulare Eigenschaften der sauren Histidin-Phosphatasen

Das HAP-Molekül besteht aus zwei Domänen, der kleineren α -Domäne und der größeren α/β -Domäne (Kostrewa *et al.*, 1997). Die α -Domäne ist bei den verschiedenen Vertretern sehr variabel gestaltet. Die α/β -Domäne besteht aus sechs antiparallel verlaufenden β -Faltblättern, die von α -Helices umgeben sind (Jakob *et al.*, 2000; Kostrewa *et al.*, 1997; Lim *et al.*, 2000). Die HAPs zeigen große strukturelle Übereinstimmungen in der α/β -Domäne. Die nicht phytatspaltenden Enzyme zeigen trotz der veränderten Substratspezifität große strukturelle Ähnlichkeiten zu den Phytasen der Gruppe der HAPs (Abbildung 8).

Die katalytischen Zentren sind zwischen den beiden Domänen eingebettet. Der katalytisch aktive Histidinrest sowie die anderen Aminosäurereste der konservierten Motive befinden sich in der α/β -Domäne.

Die sauren Histidinphosphatasen besitzen ein Molekulargewicht von ca. 40 - 100 kDa und können polymere Formen bilden (Kostrewa *et al.*, 1999). Die bakteriellen Phytasen sind mit 40 - 50 kDa etwas kleiner als die glykosylierten Pilz-Phytasen, welche ein Molekulargewicht bis zu 100 kDa aufweisen. Deutliche Unterschiede sind in den isoelektrischen Punkten (IPs) und in den elektrostatischen Potentialen zu verzeichnen. Die IPs variieren, abhängig von der Glykosylierung zwischen 4,5 bis ca. 9,0.

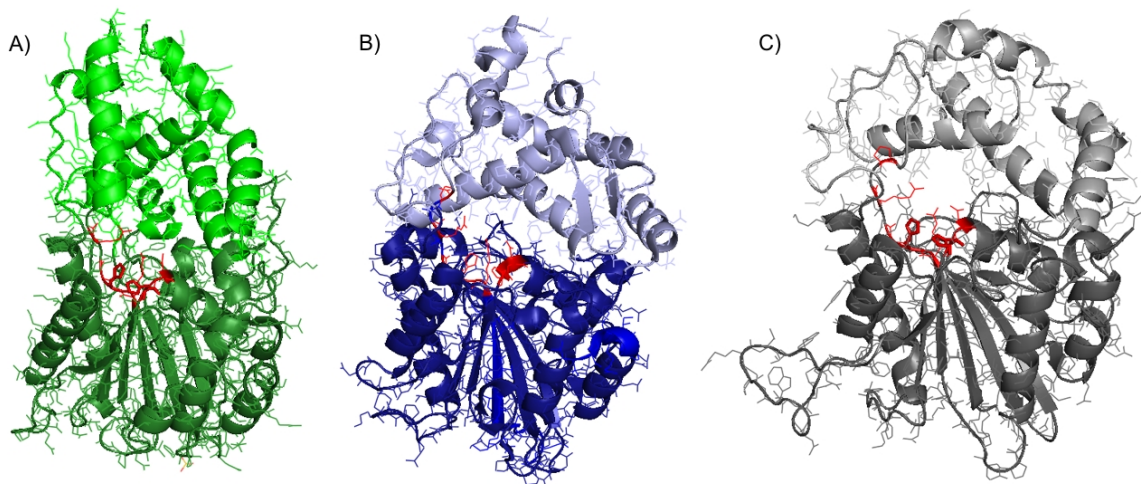


Abbildung 8: Kristallstrukturen der sauren Histidin Phosphatasen, der Phytase aus *Aspergillus niger* (A) (pdb: 1IHP – grün), Phytase aus *E. coli* (B) (pdb: 1DKL - blau) und die humane saure Prostata Phosphatase (C) (pdb: 1CVI - grau). Die variablen α -Domänen sind hell und die strukturell konservierten α/β -Domänen, mit den sechs antiparallel verlaufenden β -Faltblättern, sind dunkel dargestellt. Die katalytischen Zentren befinden sich zwischen den beiden Domänen. Die katalytisch bedeutenden Histidinreste des aktiven Zentrums und die Aminosäuren der konservierten Proteinmotive, RHGxRxP und HD, sind rot dargestellt. Die HD-Motive sind endständig an je einer α -Helix der α/β -Domäne lokalisiert.

1.3.4.2. Die katalytische Aktivität der sauren Histidinphosphatasen und Phytatabbauwege der mikrobiellen Phytasen

Die Histidin- und Argininreste der konservierten Motive bestimmen die Aktivität der sauren Histidinphosphatasen (Ostanin *et al.*, 1992). Die hydrolytische Abspaltung des Phosphatrestes des Phosphomonoesters erfolgt nach einem Zweischritt-Mechanismus. Im ersten Schritt wirkt der Histidinrest des RHG/NxRxP-Motivs als nukleophiler Akzeptor und greift durch seine positive Ladung direkt den abzuspaltenden Phosphatrest an. Es wird ein Phosphohistidin als Zwischenprodukt gebildet. Im zweiten Schritt wirkt der Asparaginrest des HD-Motivs als Protonendonator (Ostanin & Van Etten, 1993; Vincent *et al.*, 1992a). Der Protonenschub bewirkt die Abspaltung des Phosphatrestes und die Freisetzung des Phosphatrestes durch Spaltung des Phosphohistidin-Zwischenproduktes. Der Histidinrest dieses Motivs spielt eine wichtige Rolle bei der Position des abzuspaltenden Phosphatrestes. Das Vorhandensein von drei Argininen, zwei innerhalb des RHG/NxRxP-Motivs und ein weiterer konservierter Arginrestrest, der in das aktive Zentrum ragt, sind für die Aktivität notwendig. Diese Reste fixieren den zu spaltenden Phosphatrest (Ostanin & Van Etten, 1993).

Die Abbauwege für Phytat sind ausführlich für die bakteriellen Phytasen aus *E. coli* und *Raoultella (Klebsiella) terrigena* oder *Klebsiella sp.* ASR1 untersucht und beschrieben worden (Greiner, Carlsson & Alminger, 2001b; Greiner & Carlsson, 2006; Sajidan *et al.*, 2004). Weiterhin sind die Abbauwege für die Phytasen aus *Saccharomyces cerevisiae* (Greiner, Alminger & Carlsson, 2001a), *Debaryomyces castellii* (Ragon *et al.*, 2008), *Candida krusei* (Quan, Fan & Ohta, 2003) und für die Pilzphytase aus *Aspergillus niger* bekannt (Wyss *et al.*, 1999a). Die meisten Phytasen hydrolysieren fünf der Phosphatreste des Phytats, als Endprodukt entsteht *myo*-Inositolmono-Phosphat (*myo*-Ins(2)P) (Greiner & Carlsson, 2006; Mullaney & Ullah, 2003; Oh *et al.*, 2006). Die Phytase aus *Debaryomyces castellii* ist derzeit der einzige Vertreter dieser Phytasegruppe, welche alle sechs Phosphatreste des Phytats hydrolysieren kann. Das Produkt dieses vollständigen Phytatabbaus ist *myo*-Inositol. Die mikrobiellen Phytasen sind ausschließlich 3- und 6-Phytasen. Demnach unterscheiden sich die Abbauwege dieser Phytasen im initialen Schritt des Phytatabbaus. Trotz des unterschiedlichen Startpunktes des Phytatabbaus wird bei den bakteriellen Phytasen als Endprodukt *myo*-Ins(2)P gebildet (Greiner *et al.*, 2001b; Greiner & Carlsson, 2006). Der verbleibende axiale Phosphatrest am *myo*-Inositolring wird wahrscheinlich aufgrund seiner exponierten Position oftmals nicht abgespalten. Die Phytatspaltungen erfolgen oft in Haupt- und Nebenabbauwegen, so dass das Phytatmolekül verschiedene Bindungspositionen einnehmen kann (Abbildung 9).

Die Abbauwege anderer phytatspaltender HAPs, wie der der Glukose-1-Phosphatase aus *E. coli*, sind meist verkürzt. Dabei wird nur ein Phosphatrest abgespalten (Cottrill *et al.*, 2002).

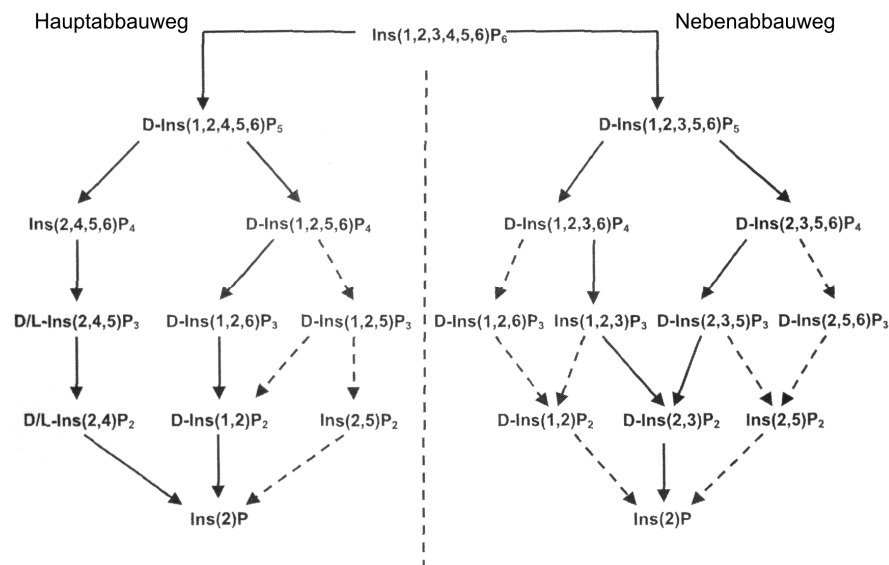


Abbildung 9: Phytatabbauweg der 3-Phytase aus *Raoultella terrigena* (*Klebsiella terrigena*) (Greiner *et al.* 2006). Der Phytaseabbau durch die Phytase aus *Klebsiella terrigena* erfolgt in einem Haupt- und Nebenabbauweg. Im Hauptabbauweg erfolgt die initiale Phosphatspaltung am C3-Atom des Phytats. Im Gegensatz dazu wird im Nebenabbauweg der Phosphatrest am C4-Rest abgespalten. Nun erfolgen weitere Abspaltungen der Phosphatreste, wobei stets einige Zwischenprodukte vorrangig erzeugt und weiter abgebaut werden. Als Endprodukt wird in beiden Abbauwegen ein Inositolmonophosphat, das Ins(2)P, gebildet.

1.4. Zielstellung

In den letzten Jahren sind die sauren Histidinphosphatasen aus *E. coli* und *Aspergillus* charakterisiert worden. Der katalytische Ablauf der Phosphatabspaltung ist gut untersucht. Dennoch ist die Funktionsweise des Phytatabbaus nicht ausreichend verstanden. Zum besseren Verständnis der Arbeitsweise von HAPs sollten weitere strukturelle und biochemische Daten von weiteren bakteriellen phytatspaltenden HAPs gesammelt werden.

Dazu sollten durch ungerichtete und gezielte Mutagenesen die Enzymeigenschaften, wie die spezifische Aktivität, das Temperatur- und pH-Spektrum sowie die Substratspezifität und das Phytatabbauspektrum, beeinflusst und verändert werden. Anhand der gewonnenen Daten sollten die an der Substratbindung beteiligten und aktivitätsbestimmenden AS-Resten sowohl für die Phytathydrolyse als auch für den Abbau von anderen Inositolphosphaten abgeleitet werden.

2. Ergebnisse

2.1. Expression der *Klebsiella* Phytase

Für die folgenden Untersuchungen sowie für die kristallographischen Arbeiten wurde das *Klebsiella*-Phytasegen kloniert und unter optimierten Bedingungen exprimiert. Das Phytasegen (*phyK*) aus *Klebsiella pneumoniae* ASR1 wurde aus der isolierten chromosomalen DNA amplifiziert und in den *E. coli* His-Tag-Plasmidvektor pET22b+ (Novagen) (Sajidan *et al.*, 2004) und in einen eigens modifizierten pFlag-CTS-Plasmidvektor (Invitrogen) kloniert. In beiden Vektoren wurde das Phytasegen hinter einer Signalsequenz ligiert (siehe Plasmidvektorkarten). Das pET22b-1TK Plasmid wurde in die *E. coli*-Expressionsstämme BL21, C41, C43 und das pFlag-His-K1 Plasmid in den BL21phoB::Tn10 Expressionsstamm transformiert und die Expression überprüft. Bei den *E. coli*- Stämmen BL21 und C41 waren die höchsten Expressionen zu verzeichnen.

Weiterhin wurde ein Hefeexpressionssystem benutzt. In den Hefevektor pBS-TEF-PHO5 wurde die Phytase ohne His-Tag und mit dem nativen Signalpeptid kloniert (Hahn *et al.*, 2006). Die Transformation des Hefevektors erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Kunze (Gatersleben) in *Arxula adenivorans*. Die *Klebsiella*-Phytase wurde in beiden *E. coli*-Expressionssystemen und in dem *Arxula*-Stamm exprimiert, was durch den polyklonalen Phytase-Antikörper und durch Phytaseaktivitätsbestimmungen überprüft wurde.

2.1.1. Expression der Phytase im *E. coli*-Expressionssystem

Für die Proteinexpression in den *E. coli* Stämmen BL21 und C41 wurden LB und TBY als Kulturmedien und die Induktoren IPTG und Laktose getestet. Im TBY-Kulturmedium konnte unabhängig vom Induktor eine stärkere Phytaseexpression, resultierend aus dem stärkeren Wachstum, verzeichnet werden. Die Phytaseexpression verlief bei Induktion mit 1 mM IPTG schneller als bei der Induktion mit 1,5 % Laktose. Jedoch führte dies zu einem schnelleren Absterben der Zellen, was die OD₆₀₀ widerspiegelte. Die Laktoseinduktion stellte eine gute Alternative zur IPTG-Induktion dar. Hier erfolgte die Proteinexpression zwar langsamer aber deutlich schonender für die Zellen. Die Phytaseaktivität konnte auch im Kulturüberstand gemessen werden, was durch eine Lyse der Zellen erklärbar wäre. Die untersuchten Expressionsstämme zeigten abhängig von der IPTG- oder Laktoseinduktion leichte Unterschiede in ihrem Expressionverhalten, so erfolgte eine höhere Expression im BL21-Stamm mit IPTG und im C41-Stamm mit Laktose (Daten nicht gezeigt).

Anhand dieser Erkenntnisse wurde Laktose als Induktor für die Phytaseexpression und später auch für die Phosphataseexpression verwendet. Die IPTG-Induktion wurde in den Phytase-Screeningtests angewandt, da hier eine schnelle Induktion bewirkt werden sollte. Die Phytase wurde sowohl aus dem Zelllysat als auch aus dem Kulturüberstand gereinigt, um möglichst eine hohe Ausbeute zu erzielen.

Reinigung mittels Ni-NTA-Säule

Die *Klebsiella*-Phytase wurde mittels Ni-NTA-Säule aus dem Lysat und dem Kulturüberstand der BL21- und C41-Stämme gereinigt (Tabelle 1 und Tabelle 2). Die getaggte Phytase zeigte eine gute Bindung an die Ni-NTA-Matrix. Nach Waschen der Matrix mit Imidazolkonzentrationen zwischen 0 mM bis 50 mM erfolgte die Elution der Phytase mit Imidazolkonzentration von 100 - 150 mM.

Tabelle 1: Beispiel Reinigungstabelle der Phytasereinigung aus C41-1TK (Lysat). Ausgangspunkt waren 5x10 ml TBY, laktoseinduzierte Kulturen. Das Pellet wurde in 35 ml Bindungspuffer aufgenommen und durch Ultraschall aufgeschlossen.

Methode	Volumen [ml]	Proteinkonz. [mg/ml]	vol. Aktivität [U/ml]	Enzymmenge [U]	spezif.Aktivität [U/mg]	Reinigungs- faktor	Ausbeute [%]
Lysat	5,3	7,024	94,530	501,000	13,670	1,000	100,0
Ni-NTA	10,0	0,191	36,960	406,560	[193,11]	14,127	81,1
Amicon 30k	0,5	2,000	785,900	392,900	392,950	28,745	78,4

Tabelle 2: Beispiel Reinigungstabelle der Phytasereinigung aus C41-1TK (Kulturüberstand). Ausgangspunkt waren 10x10 ml TBY, laktoseinduziert Kulturen. Der Kulturüberstand wurde mit einem 1 M Tris/HCL-Puffer pH 7,5 und 5 M NaCl auf die Molarität des His-Tag-Bindungspuffers eingestellt.

Methode	Volumen [ml]	Proteinkonz. [mg/ml]	vol. Aktivität [U/ml]	Enzymmenge [U]	spezif.Aktivität [U/mg]	Reinigungs- faktor	Ausbeute [%]
Kulturüberstand	125,0	0,354	17,940	2242,500	50,640	1,000	100,0
Ni-NTA	18,0	0,131	39,244	706,392	[298,59]	5,896	31,5
Amicon 30k	2,8	0,786	288,660	808,248	367,370	7,255	36,0

Nach beiden Proteinisolationen konnten die gereinigten Phytasen mit einem Molekulargewicht von ca. 42 kDa im coomassiegefärbten SDS-Gel identifiziert werden (Abbildung 10).

Nach dem Aufkonzentrieren der gereinigten Proteine aus dem Kulturüberstand und aus dem Lysat wurden geringe Mengen an proteolytisch abgebauter Phytase und Spuren anderer Proteine in der SDS-PAGE sichtbar. Die Verunreinigungen ließen sich jedoch nicht durch weitere Reinigungsschritte abtrennen. So konnte in einer anschließenden Gelfiltration kein zusätzlicher Reinigungseffekt erzielt werden. Vermutlich handelte es sich

bei den Verunreinigungen um Proteine, die Wechselwirkungen mit der nativen Phytase eingehen und deshalb nicht abgetrennt werden konnten. Der Reinigungsfaktor für die Proteingewinnung aus dem Zelllysats war mit ca. 29 erwartungsgemäß höher als bei der Reinigung aus dem Kulturüberstand. Hier wurde ein Reinigungsfaktor von ca. 7 bestimmt. Die spezifische Aktivität der aus dem Zelllysats gereinigten rekombinanten *Klebsiella*-Phytase wurde mit 392,95 U/mg bestimmt und war nur geringfügig höher als die aus dem Kulturüberstand isolierten Phytase (Tabelle 1), die eine spezifische Aktivität von 367,3 U/mg besaß (Tabelle 2). Auffällig waren die starken Abweichungen zwischen der spezifischen Aktivität der verdünnten Probe (193,11 U/mg) und der stark konzentrierten Probe (393 U/mg). Deshalb wurden die spezifischen Aktivitäten ausschließlich bei den stark aufkonzentrierten Proteinproben bestimmt.

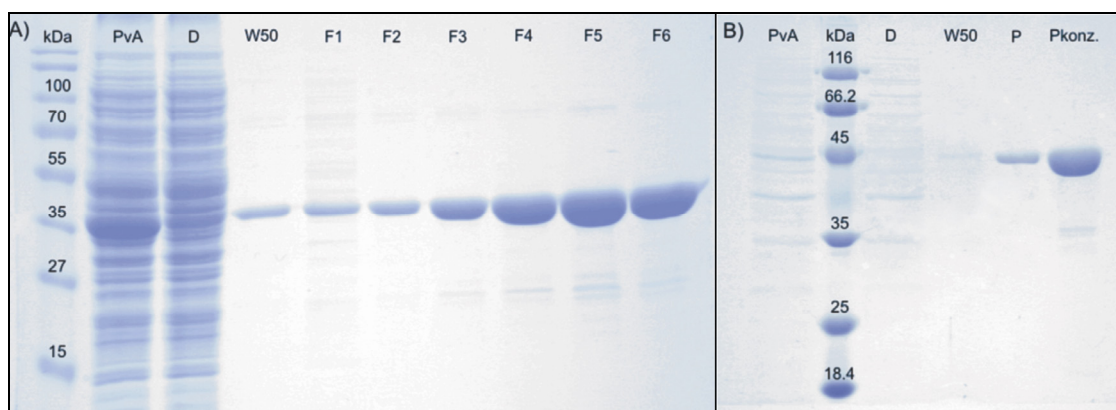


Abbildung 10: Coomassie gefärbte SDS-Gele der His-Tag-Reinigung der Phytase aus dem Zelllysats und dem Kulturüberstand. A) 12 % SDS-PAGE, Marker: 6 µl Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas); PvA: 12 µl des Zelllysats (Probe vor dem Auftragen auf die Säule); D: 12 µl des Durchlaufs der Ni-NTA-Säule; W50: 12 µl der Waschfraktion (Waschpuffer mit 50 mM Imidazol); F1-F2: 12 µl der Elutionsfraktionen (100 mM Imidazol); F3-F6: 12 µl Elutionsfraktionen (150 mM Imidazol); B) 12 % SDS-PAGE, Marker: 6 µl Unstained Protein Molecular Marker (Fermentas); PvA: 12 µl des Kulturüberstandes (Probe vor dem Auftragen auf die Säule); D: 12 µl Durchlauf der Ni-NTA-Säule; W50: 12 µl der Waschfraktion, (Waschpuffer mit 50 mM Imidazol); P: 12 µl des Proteinpools nach der His-Tag-Reinigung; Pkonz.: 3 µl der ankonzentrierten, gereinigten Proteinprobe

Reinigung der Phytase mittels FPLC (HiTrap-Säule)

Die „Fast Protein Liquid Chromatography“-Reinigung (FPLC-Reinigung) der *Klebsiella* Phytase (Abbildung 65) aus dem Zelllysats, unter Verwendung der nickelbeladenen HiTrap Chelating HP-Säule, erzielte keinen zusätzlichen Reinigungseffekt im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Reinigungen (Abbildung 10). Dennoch konnte die Proteinausbeute wesentlich erhöht werden und die Elution erfolgte erst ab einer Imidazolkonzentration über 150 mM (Abbildung 65). Dies deutete auf eine bessere Bindung an die nickelbeladene HiTrap-Säule hin. Die SDS-PAGE-Analyse der Reinigungsfraktionen zeigte ähnliche Verunreinigungen durch Fremdproteine (Abbildung 65 SDS-PAGE). Diese

Tatsache verstärkte die Vermutung, dass diese Proteine mit der Phytase Wechselwirkungen eingehen könnten und deshalb unter nativen Bedingungen zusammen mit dieser gereinigt werden.

Auch nach dieser Reinigung konnte der negative Effekt, der durch die Verdünnung des Enzyms auftritt, gemessen werden. Die Aktivitäten sanken bis zu 50 % durch Verdünnung der Enzymlösung in Wasser oder Na-Acetatpuffer. Dabei beeinflusste die Inkubationsdauer der verdünnten Proben die Höhe der Aktivitäten. Verdünnte Proben, deren Aktivitäten sofort bestimmt wurden, zeigten höhere Aktivitäten als länger inkubierte Proben. Die Verdünnungen wirkten offensichtlich destabilisierend auf das Enzym (siehe Reinigungstabellen). Die ermittelten Werte lagen bei den FPLC gereinigten Phytasen auch nach einer Dialyse gegen 20 mM Tris-HCL und 125 mM NaCl, je nach Verdünnung und Inkubation, nur zwischen 160 U/mg und 210 U/mg. Durch den Zusatz von Serumalbumin, BSA, zu den Testansätzen konnte der starke Aktivitätsverlust verhindert werden. Der Einfluss von BSA auf die Aktivität der Phytase wurde bereits für die *E. coli*-Phytase (AppA) beschrieben (R.Greiner, 1993). Demnach bewirkte die Zugabe von mindestens 20 µg/ml BSA zum Testansatz eine Stabilisierung der Phytase und führte zu konstanten Aktivitätsmessungen. Im Vergleich zur *E. coli*-Phytase konnte eine stabilisierende BSA-Wirkung auf die Aktivität der *Klebsiella* Phytase erst ab einer Konzentration von 80 µg/ml verzeichnet werden (Abbildung 11). Dies war ein Indiz für eine geringere Enzymstabilität der *Klebsiella*-Phytase in wässrigen Lösungen.

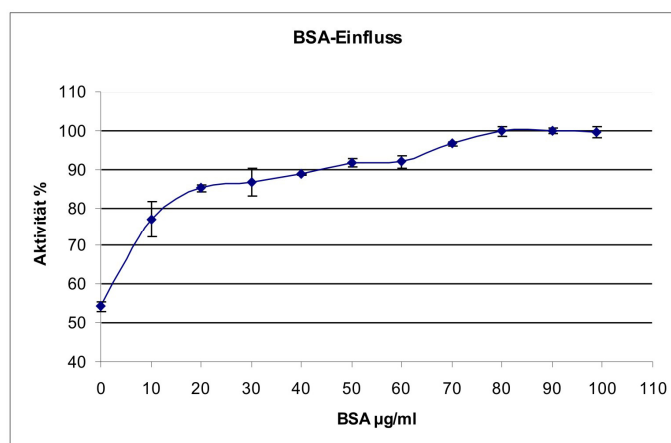


Abbildung 11: Einfluss der BSA-Konzentration auf die Aktivität der *Klebsiella*-Phytase. Die Phytase wurde in der entsprechenden BSA Lösung verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Aktivitäten wurden mit 5 mM Na-Phytat in 100 mM Na-Acetat pH 5,0 bei 37 °C bestimmt und gegen die BSA-Konzentration aufgetragen. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und die maximale Phytaseaktivität 100 % gesetzt.

Für die FPLC gereinigte *Klebsiella*-Phytase konnte, nach Zusatz von BSA, eine spezifische Aktivität von 380 - 387,2 U/mg bestimmt werden. Für die Berechnungen der spezifischen Aktivitäten wurden die Proteinbestimmungen nach Bradford sowie die UV-Proteinbestimmung der bei 280 nm (E_{280}) herangezogen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Reinigungstabelle der FPLC Reinigung der Phytase aus BL21phoB-pFlag-His-K1 (Lysat) und Darstellung der spezifischen Aktivitäten mit und ohne BSA

Methode	Volumen [ml]	Proteinkonz. [mg/ml]	vol. Aktivität [U/ml]	Enzymmenge [U]	spezif. Aktivität +BSA [U/mg]	spezif. Aktivität -BSA [U/mg]
FPLC nach Dialyse Bradford	4,0	0,442	168,100	672,400	380,743 (+/-10,775)	160,736 (+/-25,172)
FPLC nach Dialyse E280nm	4,0	0,434	168,100	672,400	387,200 (+/-10,959)	---

Bedingt durch die höhere Proteinausbeute sowie für eine bessere Reproduzierbarkeit der Proteinreinigungen wurden alle nachfolgenden Reinigungen mit der HiTrap Chelating HP-Säule und dem FPLC-Programm für die 1 ml oder 5 ml Säulen (siehe Anhang) durchgeführt. Die Bestimmungen der spezifischen Aktivitäten erfolgten mit verdünnten Enzymlösungen unter Zugabe von 80 µg/ml BSA.

2.1.2. Expression der *Klebsiella*-Phytase in *Arxula adeninivorans* und Reinigung aus dem Kulturüberstand

Die Hefeklone p9 und p12 stellten Phytasetransformanten des *Arxula adeninivorans* Stammes G1211 dar (Wartmann *et al.*, 2003). Die Anzucht der Hefen erfolgte wie unter 5.1.2.4. beschrieben im YMM und im YEPD-Medium. Die Expression erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven *Arxula*-TEF1-Promotors und des *Saccharomyces cerevisiae* PHO5-Terminators (Wartmann *et al.*, 2003). Bei beiden Klonen konnte die Phytaseaktivität nach dreitägiger Inkubation in den Kulturüberständen nachgewiesen werden, dabei stieg diese nur leicht in den folgenden drei Tagen. Im YEPD-Überstand wurde eine Volumenaktivität von ca. 1 U/ml (37 °C, pH 5,0) bestimmt. Die Phytaseaktivität im Hefeminimalmedium konnte aufgrund der hohen Phosphatkonzentration im Medium nicht direkt bestimmt werden.

Der Nachweis der Expression erfolgte mittels des polyklonalen *Klebsiella*-Phytase-Antikörpers (Abbildung 12). Die Phytase war ausschließlich im Kulturüberstand nachzuweisen. Das native *Klebsiella*-Signalpepid bewirkte auch im *Arxula*-Hefeexpressionssystem eine Sekretion der Phytase in den Kulturüberstand.

Die Reinigung der *Klebsiella*-Phytase erfolgte direkt aus dem Hefe-Kulturüberstand durch Ammoniumsulfatfällung und einer anschließenden FPLC-Reinigung unter Verwendung der CM Sepharose-Säule. Im Kulturüberstand wurde die *Klebsiella*-Phytase als schmale Einzelbande (ca. 42 kDa) im SDS-Gel und Western Blot identifiziert (Abbildung 12 A und B). Nach Konzentrieren des Überstandes und anschließender Dialyse wurden weitere Proteinbanden sichtbar (Tabelle 4).

Im Western Blot wurden neben den Phytasenbanden weitere Proteine durch den *Klebsiella*-Phytaseantikörper detektiert (Abbildung 12 B-Pool), die als Verunreinigungen angesehen werden können. Es war eine Proteinbande oberhalb der ungetaggen Phytasebande (Pool) sichtbar und konnte relativ stark im Immunoblot detektiert werden. Dabei könnte es sich um eine unprozessierte Form der *Klebsiella*-Phytase handeln.

Für die Reinigung aus dem *Arxula*-Kulturüberstand konnte ein Reinigungsfaktor von 38 ermittelt werden. Für die gereinigte Phytase wurde eine spezifische Aktivität von 481,7 U/mg bestimmt. Somit war die spezifische Aktivität deutlich höher als die Aktivität des getaggen und in *E. coli* exprimierten Proteins.

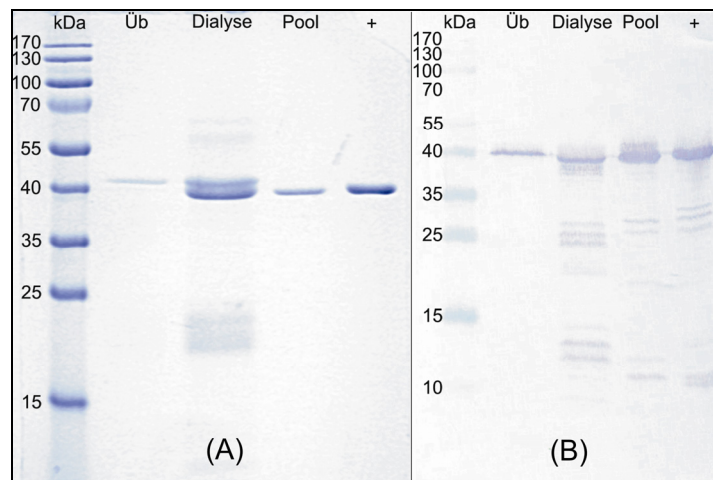


Abbildung 12: SDS-Gel und Western Blot der Reinigungsschritte der Phytasereinigung aus dem *Arxula*-Kulturüberstand.

(A): Gezeigt ist das 12 % coomassiegefärbte SDS-Gel der Proteinpools vor der Reinigung und nach den Reinigungsschritten. Es wurden 6 µl des Markers (kDa) (PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas)), 15 µl (ca. 0,3 µg) des Hefekulturüberstandes (Üb), 15 µl der Ammoniumsulfat gefällten und dialysierten Probe des Überstandes (Dialyse), 15 µl (0,63 µg) der FPLC (CM Sepharose) gereinigten Phytaseprobe (Pool) sowie 7 µl (1,4 µg) der His-Tag gereinigten *Klebsiella*-Phytase als Kontrolle (+) aufgetragen.

(B): Für den Western Blot wurden 6 µl des Markers (kDa) (PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas)), 10 µl (0,2 µg) des Hefekulturüberstandes (Üb), 10 µl der Ammoniumsulfat gefällten und dialysierten Probe des Überstandes (Dialyse), 10 µl (0,42 µg) der FPLC (CM Sepharose) gereinigten Phytaseprobe (Pool) sowie 3 µl (0,6 µg) der His-Tag gereinigten *Klebsiella*-Phytase als Kontrolle (+) auf ein 12 % Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Blotting des Gels auf eine Nitrozellulosemembran wurde der Blot mit dem ersten Antikörper (*Klebsiella*-Antikörper (Kaninchen)) und mit dem zweiten Antikörper (mit alkalischer Phosphatase gekoppelt (Ziege)) inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mit NBT und BCIP.

Tabelle 4: Reinigungstabelle der Phytasereinigung aus *Arxula* p12

Methode	Volumen [ml]	Proteinkonz. [mg/ml]	vol. Aktivität [U/ml]	Enzymmenge [U]	spezif.Aktivität [U/mg]	Reinigungs- faktor	Ausbeute [%]
Kulturüberstand	400,0	0,076	0,948	379,299	12,509	1,000	100,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ Fällung	40,0	0,380	10,998	439,930	28,922	2,312	116,0
Dialyse	52,0	0,248	6,270	326,025	25,268	2,020	86,0
0,45µm Filter	52,0	0,230	5,631	292,846	24,499	1,959	77,2
CM Sepharose	11,5	0,042	19,991	229,899	481,717	38,509	60,6

2.1.3. Biochemische Eigenschaften der exprimierten Phytasen aus *Arxula* und *E. coli*

Die *Arxula* ist, wie andere Hefen, in der Lage, Proteine durch Mannosemoleküle zu glykosylieren. Die Glykosylierung erfolgt an einem Asparaginrest in einem Asn-Xaa-Ser/Thr-Motiv. Diese N-Glykosylierung kann bestimmte Proteineigenschaften, wie Thermostabilität, spezifische Aktivität und den isoelektrischen Punkt beeinflussen. Durch Analyse der Proteinsequenz der *Klebsiella*-Phytase mit dem NetNGlyc 1.0 Server (Technical University of Denmark) konnte ein Asn-Phe-Ser-Motiv identifiziert werden, welches jedoch nicht als eine potentielle N-Glykosylierungsstelle ausgewiesen wurde. Um dennoch eine mögliche Glykosylierung der Hefe-exprimierten Phytase nachzuweisen, erfolgte eine PAS-Färbung (Schiff'sche-Färbung). Im PAS gefärbten Polyacrylamidgel war keine Färbung der Phytasebande zu erkennen. Damit wurde eine Glykosylierung der Phytase ausgeschlossen. Die in Hefe und in *E. coli* exprimierten Phytasen zeigten bezüglich der spezifischen Aktivitäten deutliche Unterschiede. Das Hefe-exprimierte Enzym ohne His-Tag besaß mit ca. 480 U/mg (Tabelle 4) eine ca. 20 % höhere spezifische Aktivität als das *E. coli*-exprimierte Enzym mit Tag (380 U/mg) (Tabelle 5).

Tabelle 5: Kinetische Parameter der *E. coli* und *Arxula* exprimierten *Klebsiella*-Phytasen (PhyK) für Phytat.

<i>Klebsiella</i> - Phytase exprimiert in	<i>K_m</i> (mM)	<i>k_{cat}</i> (s ⁻¹)	<i>k_{cat} / K_m</i> (s ⁻¹ * mM ⁻¹)	spezif. Aktivität berechnet (U / mg)	spezif. Aktivität gemessen (U / mg)
<i>E.coli</i> ±	0,047 0,019	373 46	7876 972	514,24 57,69	380,74 10,78
<i>Arxula</i> ±	0,046 0,037	612 32	13378 700	876,15 47,53	481,72 ---

Die kinetischen Konstanten der exprimierten Phytasen spiegelten die bereits beschriebenen Unterschiede in den spezifischen Aktivitäten wider.

Die *K_m*-Werte der Phytasen, für Phytat als Substrat, waren etwa gleich. Für die beiden Phytasen wurden *K_m*-Werte von 0,046 mM und 0,047 mM bestimmt, was also auf etwa gleiche Affinitäten der Phytasen zum Phytat hindeutete. Die Enzymwechselzahl (*k_{cat}*-Wert) der Hefe-exprimierten Phytase war mit ca. 600 s⁻¹ deutlich größer als der Wert des in *E. coli* exprimierten Enzyms (ca. 380 s⁻¹). Die in Hefe exprimierte Phytase besitzt folglich eine höhere katalytische Effizienz, was auch der ermittelte *k_{cat}/K_m*-Quotient von 13378 s⁻¹·mM⁻¹ verdeutlicht.

Auffällig waren die starken Abweichungen zwischen den berechneten und den im Standard-Phytasetest ermittelten Werten der spezifischen Aktivitäten. Während der *K_m*-Wert-Bestimmung wurde eine Substrathemmung durch Phytat festgestellt. Deshalb

erfolgten diese Bestimmungen bis zu einer Phytatkonzentration von 0,6 mM. Im Standard-Phytasetest wurde eine deutlich höhere (5 mM) Phytatkonzentration verwendet. Wahrscheinlich wurden, aufgrund der Substrathemmung in Standard-Test, geringere spezifische Aktivitäten bestimmt.

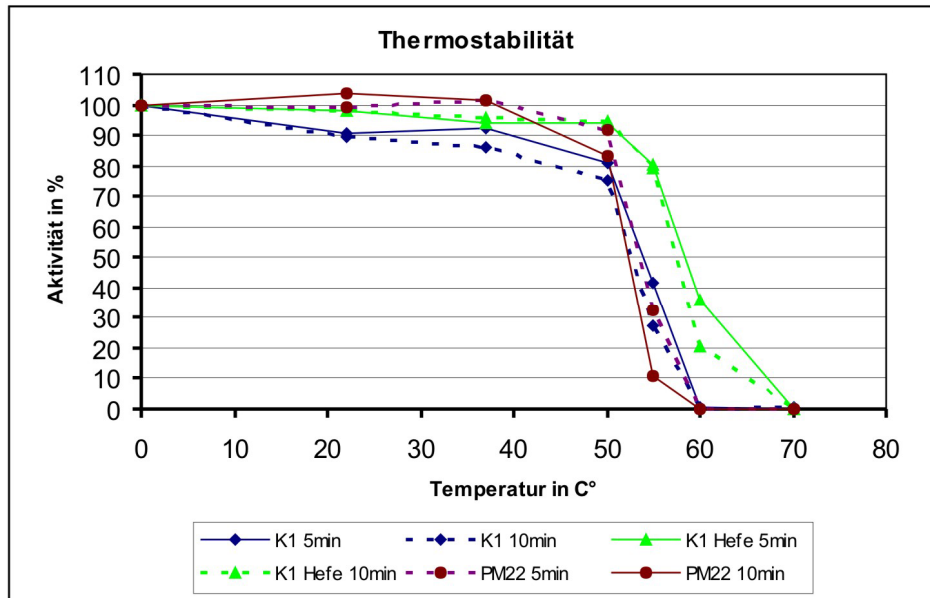


Abbildung 13: Thermostabilität der aus *E. coli* und *Arxula* gereinigten *Klebsiella*-Phytase. Die Thermostabilität wurde für 5 min und 10 min Inkubation der Phytase bei 20 - 70 °C in einer 0,15 % BSA Verdünnung und in Doppelbestimmungen ermittelt. Gezeigt sind die bei 37 °C bestimmten Aktivitäten in %. Für den Nullwert stehen die Aktivitäten in % ohne Vorinkubation der Proben. Die durchgezogenen Linien stehen für eine Inkubation von 5 min und die gestrichelten Linien für eine 10 minütige Inkubation bei den jeweiligen Temperaturen. Die Aktivitäten der His-getaggte *Klebsiella*-Phytase PhyK (K1 5min / K1 10min) sind durch blaue Messpunkte (Vierecke), die Messpunkte der Aktivitäten der in Hefe exprimierten Phytase (K1 Hefe 5min / K1Hefe 10min) sind durch grüne Dreiecke und die Messpunkte der Aktivitäten einer *Klebsiella*-Phytasemutante PM22 (PM22 5min / PM22 10min) sind mit roten Punkten dargestellt.

Des Weiteren wurde für die in Hefe exprimierte Phytase eine leicht erhöhte Thermostabilität verzeichnet. Die Stabilität erhöhte sich um ca. 5 °C (Abbildung 13). Ab einer Inkubationstemperatur von mehr als 50 °C zeigten die *E. coli*-exprimierten Phytasen (PhyK und PM22) einen deutlichen Aktivitätsverlust. Bei 55 °C wurden weniger als 50 % der Aktivität bestimmt. Ab einer Temperatur von 60 °C war eine vollständige Inaktivierung des getaggtten Enzyms zu verzeichnen. Die Hefe-exprimierte Phytase besaß bei 55 °C 80 % Phytaseaktivität und je nach Inkubationsdauer von 5 - 10 min bei 60 °C noch 20 - 30 % Restaktivität.

Die pH- und Temperatur-Optima zeigten keine Veränderungen. Die pH-Optima lagen bei pH 5,0 und die Temperatur-Optima bei ca. 52 °C (Daten nicht gezeigt). Für die beiden Phytasen konnten jeweils theoretische isoelektrische Punkte (IPs) von ca. 8,5 bestimmt und experimentell IPs von ca. 9,0 ermittelt werden. Dies wies ebenfalls auf eine fehlende Glykosylierung hin.

In den HPIC-Analysen wurden die Substratabbauprodukte identifiziert. Beide Phytasen zeigten den für die *Klebsiella*-Phytase typischen Phytatabbau (Abbildung 27 / Abbildung 28). Es wurden die Phytatabbauprodukte D-Ins(1,2,4,5,6)P5, Ins(2,4,5,6)P4, D-Ins(1,2,5,6)P4, D/L-Ins(2,4,5)P3 / D-Ins(1,2,6)P3 und D/L-Ins(2,4)P2 / D-Ins(1,2)P2 identifiziert.

2.2. Kristallisation und Struktur der Phytase aus *Klebsiella*

Eine wichtige Voraussetzung für die Funktionsanalyse der Unterschiede zwischen *E. coli*-Phytase und *Klebsiella*-Phytase sowie für die Mutationsanalysen der Phytasen stellt die Strukturaufklärung dar. Dabei sollte die Kristallisation möglichst mit und ohne Substrat (Phytat) erfolgen, um so Erkenntnisse über die Substratbindung und die daraus folgenden Konformationsänderungen im aktiven Zentrum zu erhalten. Das Phytaseprotein wurde mittels His-Tag gereinigt und nach Vorbereitung der Probe (Gelfiltration, Dialyse und Ankonzentrierung) für die Kristallisation eingesetzt. Die ersten Kristallisationen waren zwar erfolgreich, die Struktur konnte jedoch aufgrund eines Phasenproblems nicht gelöst werden. Deshalb wurde eine Selenomethioninvariante der Phytase erzeugt und somit die Struktur erfolgreich gelöst. Des Weiteren wurden Kokristallisationen mit dem Substrat unter Verwendung einer inaktiven *Klebsiella*-Phytasemutante durchgeführt. Diese konnten zwar ebenfalls vermessen und Daten ausgewertet werden, allerdings war die Phytatbindung nicht nachweisbar. Deshalb wurde nach weiteren Kokristallisationsbedingungen und Kristallformen gesucht.

2.2.1. Die Kristallisation der *Klebsiella*-Phytase

2.2.1.1. Erzeugung und Isolierung der *Klebsiella*-Phytasevarianten

Die ersten Kristallisationsansätze wurden mit der in C41-1TK exprimierten His-getaggen Phytase durchgeführt. Die Reinigung erfolgte aus dem Zelllysats mittels der HiTrap Chelating HP-Säule, wie bereits im Kapitel 2.1.1. beschrieben wurde. Der Reinigungsgrad entsprach den beschriebenen Reinigungen (FPLC-Reinigung). Die gereinigte Probe zeigte keine weiteren Verunreinigungen in dem Proteinspektrum (Abbildung 14). Die Proteinproben konnten stabil über mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden.

Unter Verwendung der erzeugten Selenomethionin-Variante der nativen getaggen Phytase wurde das auftretende Phasenproblem und damit die Struktur gelöst. Diese Variante wurde, wie unter 5.1.2.3. beschrieben, hergestellt und gereinigt. Es erfolgte eine sehr schwache Proteinexpression durch den B834-Stamm in dem mit Selenomethionin angereichertem NMM. Dementsprechend wurde sehr wenig Protein gereinigt. Durch eine anschließende Gelfiltration, zur Erhöhung des Reinigungsgrads, wurden nicht alle

Verunreinigungen abgetrennt. Trotzdem waren der erzielte Reinheitsgrad und die Proteinkonzentration für die Kristallisation ausreichend.

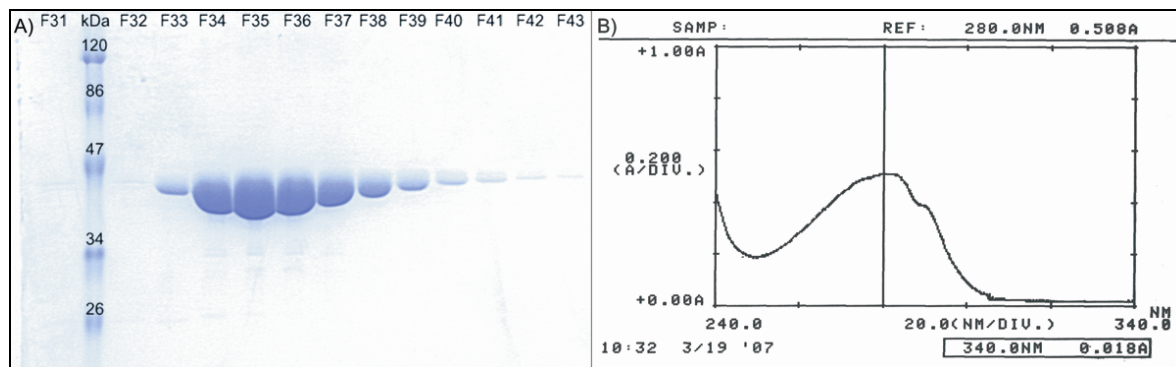


Abbildung 14: Coomassiegefärbtes SDS-Gel der Kleb-M1-Reinigung und Proteinspektrum. Abbildung A) zeigt das 12 % SDS-Gel der Fraktionen F31-F43 der FPLC-Reinigung unter Verwendung einer 5 ml HiTrap-Säule. Es wurden 12 µl je Spur und 6 µl des Markers (Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)) aufgetragen. Die Abbildung B) zeigt das Proteinspektrum (240 - 340 nm) der gepoolten und auf 13,4 mg/ml ankonzentrierten Proteinprobe in 25 mM Na-Acetat pH 5,3, 60 mM NaCl. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte bei 280 nm (E₂₈₀).

Für die Kokristallisation mit Substrat wurde eine inaktive Phytasemutante His25Ala (Kleb-M1) erzeugt. Diese inaktive Mutante sollte das Phytat binden, ohne es zu hydrolysieren. Hierfür wurde der katalytisch aktive Histidinrest (His25), wie schon bei anderen Kristallisationen von sauren Histidinphosphatasen und Phytasen beschrieben, gegen einen Alaninrest (Ala25) ausgetauscht (Lim *et al.*, 2000). Nach der Aufreinigung wurde die Restaktivität bei 22 °C und pH 5 überprüft. Nach 9 tägiger Substratinkubation konnte keine Phytaseaktivität detektiert werden. Direkt vor Verwendung der Proteinlösung für die Kristallisation wurde ein Proteinspektrum von 240 nm bis 340 nm aufgenommen, um die Reinheit und die Proteinkonzentration (E₂₈₀) genau zu bestimmen (Abbildung 14 B). Der für die Bestimmung der Konzentration benötigte Extinktionskoeffizient wurde aus der Aminosäuresequenz mit Hilfe des ExPASy-Servers und des ProtParam-Tools ermittelt. Ein Extinktionsfaktor von 1,462 wurde letztlich für die Konzentrationsbestimmung herangezogen.

2.2.1.2. Kristallisationsbedingungen, Kristalle, Datensätze und Strukturlösung der *Klebsiella*-Phytase

Die native, getaggte Klebsiella-Phytase und die Selenomethioninvariante

Die durch Kerstin Böhm (AG Prof. Heinemann) erzeugten Kristalle entstanden unter Natriumformiat-Bedingungen. Die Probe wurde in 25 mM Na-Acetat pH 5,3 und 60 mM NaCl mit 1 mM DTT vorbereitet. Im Kristallisationsansatz wurden 1 µl der 5 mg/ml konzentrierten Proteinlösung vorgelegt und mit 1 µl Reservoirlösung, ohne mischen,

zusammen pipettiert. Die Kristallisationen erfolgten nach der Methode des ‚hängenden Tropfen‘ („hanging drop“). Es wurden 750 µl einer 4 M Natriumformiatlösung (pH 7,6) als Reservoir benutzt. Der Kristallisationsansatz wurde bei 18 °C inkubiert. Nach 5 Wochen zeigten sich die ersten Proteinkristalle (Abbildung 15 A).

Unter identischen Bedingungen kristallisierte das Selenomethionin-inkorporierte Protein der Phytase. Die Kristalle besaßen eine maximale Größe von ca. 250 µm x 250 µm x 150 µm und konnten nach Zusatz von 6 % (v/v) Glycerin in Stickstoff eingefroren werden. Die Aufnahme der Datensätze erfolgte bei einer Temperatur von 100 K am BESSY, wobei die native Phytase am BL14-2 und die Selenomethion-Variante an BL14-1 vermessen wurden. Die Auflösung des Kristalls der Selenomethion-Variante war mit 2,04 Å geringer als die der nativen Phytase (1,75 Å) (Tabelle 6). Die Kristalle wiesen eine P₄₃2₁2 Raumgruppe auf, die einer primitiven tetragonalen Gitterstruktur (Tabelle 6) mit einer Dimension von $a = 133,69 \text{ Å}$, $c = 111,24 \text{ Å}$ entspricht. Die asymmetrischen Kristallisationseinheiten bestanden aus je zwei Molekülen.

Tabelle 6: Parameter der Messung der Phytase-Kristalle

	Formiat-Kristalle		PEG-Kristall -Öl
	Se-Met-Variante	Native Phytase	Mutante M1
Raumgruppe	P ₄ ₃ 2 ₁ 2 2 Moleküle/au	P ₄ ₃ 2 ₁ 2 2 Moleküle/au	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ 4 Moleküle/au
Wellenlänge [Å]	0,9793	0,8984	0,81
Auflösung [Å]	95,35-2,04	94,49-1,65	50,00-2,58
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	15,1	15,0	17,98
Durchschn.Redundanz	4,3	5,7	5,1
Vollständigkeit: ov./l.s.	97,6 / 94,8	94,1 / 72,9	98,1 / 81,2
Zelle a/b/c [Å]	133,99 / 133,99 / 111,31	133,69 / 133,69 / 111,24	81,71 / 122,93 / 205,40
R _{sym} [%]: ov./l.s.	6,6 / 28,6	6,9 / 40,9	8,2 / 24,5

Die inaktive Phytasemutante His25Ala (Kleb-M1)

Die inaktive Mutante His25Ala der *Klebsiella*-Phytase kristallisierte unter identischen Bedingungen wie die zuvor kristallisierten Varianten.

Der Versuch das Substrat durch Kokristallisation im aktiven Zentrum darzustellen war weniger erfolgreich, da die Elektronendichten des *myo*-Inositolrings nicht sichtbar waren. Lediglich die Elektronendichte eines Phosphatrestes in der Nähe des ausgetauschten Alaninrestes war erkennbar. Nach diesen erfolglosen Versuchen ein Proteinkristall mit gebundenem Phytat zu erzeugen, wurde nach neuen Kristallisationsbedingungen gesucht.

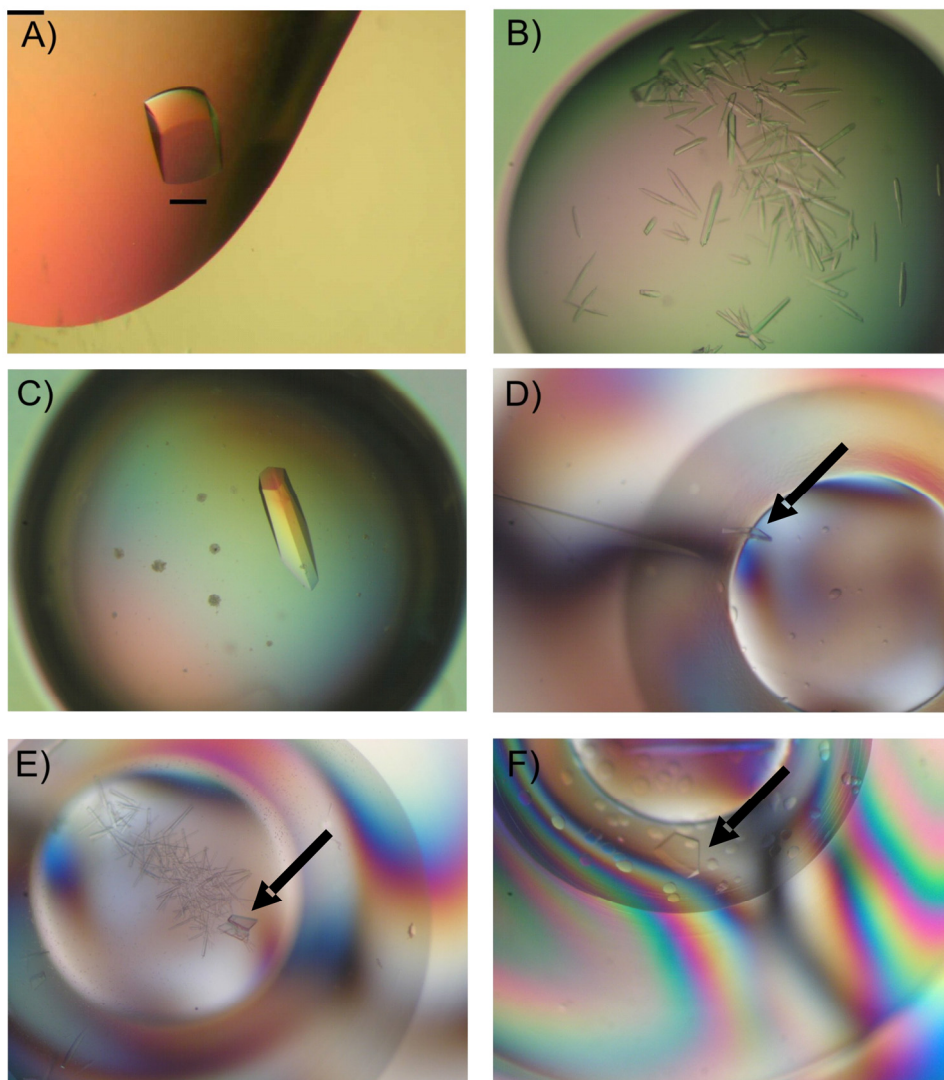


Abbildung 15: Kristallansätze der *Klebsiella*-Phytase und inaktiven Mutante. A): Kristall der nativen *Klebsiella*-Phytase mit Na-Formiat-Bedingung nach Kerstin Böhm; B) und C): Die Kristallansätze (3 μ l) der inaktiven *Klebsiella* Phytasemutante M1 bestanden aus 7 - 7,5 % PEG8000, 0,05 M Na-Acetat pH 4,5, 0,05 - 0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mit 2,5 mg/ml des konzentrierten Proteins und 1,5 mM Phytat. Als Reservoirolösung wurden 14 - 15% PEG8000, 0,1 M Na-Acetat pH 4,5, 0,1 - 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ verwendet. D), E) und F): „Microbatch“-Kristallansätze der inaktiven *Klebsiella*-Phytasemutante M1. Die Kristallisationen erfolgen in einem Ansatz, in dem 1,5 μ l einer 2,5 mg/ml bis 5 mg/ml konzentrierten, 3 mM phytathaltigen Proteinlösung (außer F) und 1,5 μ l von 28 % - 24 % PEG8000, 0,2 M Na-Acetat pH 4,5 und 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ die unter Paraffinöl zusammen pipettiert wurden. Im Ansatz F) war kein Phytat enthalten.

Im JB Screen Classic 1-10 (Jena Bioscience) konnte eine Kristallbildung nach 3 Wochen Inkubation bei 22 °C unter Verwendung von 1 μ l 12 % PEG4000, 0,1 M Na-Acetat pH 4,6 und 0,2 M Ammoniumsulfat und 1 μ l der Proteinlösung 8 mg/ml mit 3 mM Phytat beobachtet werden. Die Kristalle waren klein, nadelförmig und sehr verwachsen. Dies stellte aber einen guten Ausgangspunkt für weitere Optimierungen der Kristallisationsbedingungen in Gegenwart von PEG dar (Anhang Tabelle 29). Weiterhin wurden verschiedene Parameter in den Kristallansätzen getestet. So wurden die Einflüsse der Proteinkonzentrationen, PEG-Arten, Salzkonzentrationen, pH-Werte und

Pufferkonzentrationen, Pufferarten, Temperatur, Tropfengröße, Kristallisationsart (Batch, hängender und sitzender Tropfen) und der Effekt von Additiven variiert und untersucht. Letztlich führte dies zu zwei optimierten Kristallisationsbedingungen.

Die *Klebsiella*-Phytase kristallisierte in einem 3 µl Ansatz bestehend aus 1,5 µl 14 - 15 % PEG8000, 0,1 M Na-Acetat pH 4,5, 0,1 - 0,2M (NH₄)₂SO₄ (auch Reservoirlösung) und aus 1,5 µl der 5 mg/ml konzentrierten Proteinlösung mit 3 mM Phytat. Die Kristallisation erfolgte im hängenden Tropfen. Es wurde ein Reservoirvolumen von 500 µl verwendet. Die Kristallbildung war in wenigen Tagen (3 - 7 Tage) bei 22 °C (Abbildung 15 B + C) zu beobachten. Dabei bildeten sich unterschiedlich dicke nadelförmige, teils sehr große Kristalle von 150 µm Breite und 600 µm Länge mit einem sechseckigen Querschnitt. Die Kristalle zeigten an den Enden stärkere Defekte, die auch auf den Seitenflächen zu beobachten waren. Die großen Kristalle waren jedoch relativ schlecht reproduzierbar. Die Auslöschung im polarisierten Licht war sehr gut. Der Versuch, einen Datensatz mit einem Kristall aufzunehmen (Abbildung 15 C), ergab keine auswertbaren Daten. Es kam zur Überlagerung von Reflexen, zudem war die Auflösung bis 8 Å sehr gering.

Anscheinend bestanden diese Kristalle aus Zusammenlagerungen von mehreren Kristallen, was für die Reflexüberlagerungen verantwortlich sein könnte. Die schlechte Auflösung von 8 Å machte es sehr schwierig, selbst bei Auswertbarkeit der Daten, eine Elektronendichte des Phytats bzw. des *myo*-Inositolrings im aktiven Zentrum nachzuweisen.

Durch die „Microbatch“-Kristallisation konnte aber eine weitere Kristallform gefunden werden. Hierbei entstanden sehr schnell (in 1 - 2 Tagen), neben sehr kleinen Kristallnadeln, 45 µm Breite und 100 µm Länge, plattenförmige Kristalle, die gut im polarisierten Licht auslöschen (Abbildung 15 D, E und F). Die Kristallbildung erfolgte in einem Ansatz, in dem 1,5 µl einer 2,5 mg/ml bis 5 mg/ml konzentrierten, 3 mM phytathaltigen Proteinlösung und 1,5 µl von 28 % - 24 % PEG8000, 0,2 M Na-Acetat pH 4,5 und 0,2 M (NH₄)₂SO₄ die unter Parafinöl zusammen pipettiert wurden. Durch den Luftabschluss unter Öl wurde die Proteinlösung nicht konzentriert. Die finale Konzentration wurde hier direkt durch das 1:1 Mischen erzielt. In Abwesenheit von Phytat war ebenfalls eine Kristallisation zu verzeichnen.

Das Kristall wurde ebenfalls mit 6 % (v/v) Glycerin in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Vermessung des Kristall (Abbildung 15 D) wurde durch Kerstin Böhm (AG. Prof. Heinemann) durchgeführt. Die Diffraktionsdaten wurden am EMBL/DESY (Hamburg, Germany), Beamline X13 aufgenommen. Das Kristall bestand aus einem orthorhombischen, primitiven Kristallgitter mit der Raumgruppe P2₁2₁2₁. Die asymmetrische Untereinheit wurde im Gegensatz zu den anderen Kristallen aus vier Phytasemolekülen gebildet. Die maximale Auflösung des Kristalls lag bei 2,58 Å (Tabelle

6). Hierbei konnten neben dem einen Phosphatrest zwei weitere Elektronendichten im aktiven Zentrum lokalisiert werden. Da hier ein hoher Überschuss an Ammoniumsulfat im Kristallisationsansatz vorlag, war es wahrscheinlicher, dass es sich bei den zwei Elektronendichten um Sulfatreste und nicht um Phosphatreste handelte. Sulfatreste weisen eine ähnliche räumliche Struktur wie Phosphatreste auf, deshalb ermöglichte dieser Umstand die Modellierung des Phytats in das aktive Zentrum. Daraus entstand ein Bindungsmodell, das als Grundlage für die Erzeugung gezielter Mutationen und die Auswertung der Mutationsdaten diente.

2.2.2. Die Struktur der *Klebsiella*-Phytase

Die Kristallstruktur der *Klebsiella*-Phytase wurde nach der SAD-Methode („single-wavelength anomalous diffraction“) gelöst (Tabelle 6). Die Konformationen der beiden Moleküle der asymmetrischen Einheit waren gleich. Es bestand lediglich eine geringe Abweichung von 0,5 Å (rms: root mean square) bei der Überlagerung der 394 C^α-Atome.

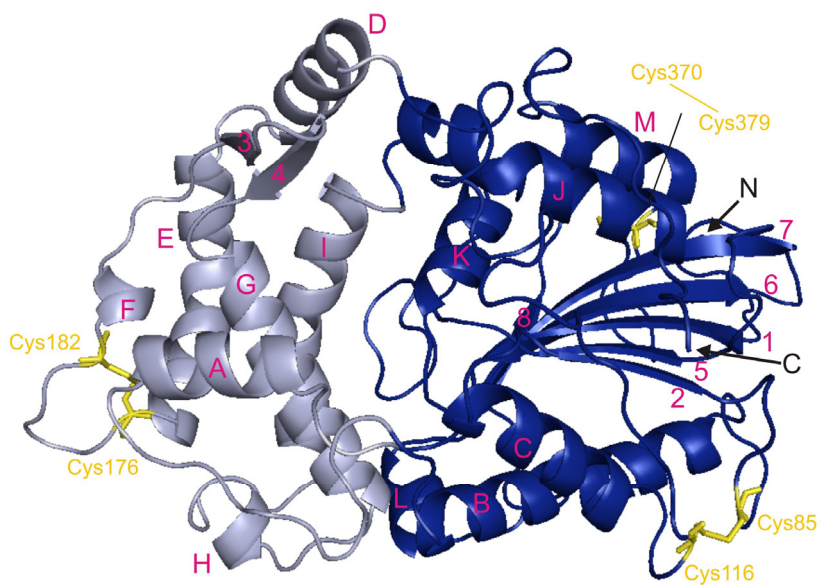


Abbildung 16: Domänen und Sekundärstrukturen der nativen getaggten *Klebsiella*-Phytase. Für die Erstellung der Abbildung der Struktur wurde Pymol v0.99 verwendet. Die Phytase besteht aus zwei Domänen, der α -Domäne (hellblau) und der α/β -Domäne (dunkelblau). Die beiden Domänen werden aus 13 α -Helices (rote Buchstaben) und 8 β -Faltblätter (rote Zahlen) gebildet. Zwischen den beiden Domänen befindet sich das aktive Zentrum, welches von den α -Helices A, G, I der α -Domäne und den Helices C, K, L der α/β -Domäne eingerahmt wird. N- und C-Terminus liegen frei und befinden sich in der α/β -Domäne. Im Molekül werden drei Disulfidbrücken ausgebildet. Die Bindungen werden zwischen den Cysteinen Cys85-Cys116, Cys176-Cys182 und nahe dem C-Terminus zwischen Cys370-Cys379 ausgebildet (gelb dargestellt). Die β -Faltblätter 3 und 4 bilden ein β -Faltblättermotiv.

Das *Klebsiella*-Phytasemolekül wird aus zwei Domänen gebildet und besaß eine globuläre Form. Die α -Domäne besteht aus sieben α -Helices (A, D, E, F, G, H, I) und zwei

kleinen β -Faltblättern (3, 4), die als β -Pin-Faltblattmotiv bezeichnet werden. Den zentralen Bereich der α/β -Domäne bilden sechs β -Faltblätter, die an zwei Seiten von je drei α -Helices (B, C, L und J, K, M) eingerahmt werden. Insgesamt konnten drei Disulfidbrücken zwischen Cysteinen Cys176-Cys182 in der α -Domäne und Cys85-Cys116, Cys370-379 in der α/β -Domäne nachgewiesen werden, die aber durch deren Lage nicht in die Katalyse involviert (Abbildung 16) sind.

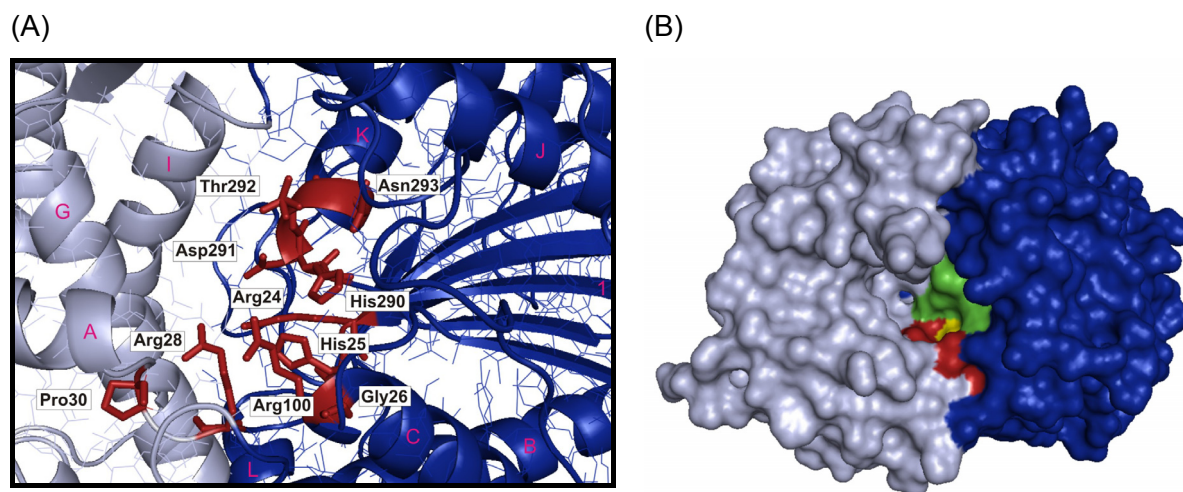


Abbildung 17: Links (A) ist das aktive Zentrum der *Klebsiella*-Phytase mit den konservierten Aminosäureresten des RHGxRxP-Motivs (Arg24, His25, Gly26, Arg28, Pro30), Arginin (Arg100) und dem HDTN-Aminosäuremotiv (His290, Asp291, Thr292, Asn293) eingebettet zwischen den α -Helices A, G, I der α -Domäne (hellblau) und den α -Helices C, K, L der α/β -Domäne (dunkelblau), dargestellt.

Rechts (B) ist die Oberfläche des Phytasemoleküls mit der α -Domäne (hellblau) und α/β -Domäne (dunkelblau) gezeigt. Das in einer Grube liegende aktive Zentrum befindet sich zwischen den Domänen. Die konservierten Aminosäurereste sind farbig gekennzeichnet. Die Reste des RHGxRxP-Motivs sind rot (Arg24, Arg28, Pro30) bzw. gelb (His25) dargestellt. Die Aminosäuren des HDTN-Motivs sind grün gekennzeichnet.

Das aktive Zentrum befindet sich zwischen den beiden Domänen und wird von den Helices A, C, G, I, K, L und den β -Faltblättern ausgebildet (Abbildung 17 links). Das aktive Zentrum bildet eine Grube, in der die katalytisch aktiven Reste eingebettet sind (Abbildung 17 B). Das aktive Zentrum, mit einer Größe von ca. 14 Å x 17 Å, bietet ausreichend Raum für die Bindung des Phytats. Sowohl im katalytischen Zentrum als auch in der unmittelbaren Umgebung befinden sich zahlreiche, positiv geladene Aminosäurereste (Abbildung 18).

Die konservierten Aminosäuren des RHGxRxP-Motivs sind in einem Loop-Bereich zwischen dem C-Terminus des β -Faltblatts 1 und dem N-Terminus der α -Helix A lokalisiert. Der ebenfalls konservierte Argininrest (Arg100) liegt am C-Terminus der α -Helix C.

Das charakteristische HD-Aminosäuremotiv (His290, Asp291) ist am N-Terminus der α -Helix K lokalisiert (Abbildung 17 links). Der Histidinrest (His25) wird durch eine H-Brücke

zwischen dem Stickstoff-Atom des Histidins (N^{δ}) und dem Sauerstoff-Atom des Glycinrestes (Gly26) fixiert. Somit kann dies den nukleophilen Angriff auf den Phosphatrest des Substrats (Phytat) ermöglichen. Der andere katalytisch wichtige Histidinrest (His290) wird ebenfalls durch die Wasserstoffbrücken zwischen dem His290 (N^{ϵ}) und dem Sauerstoffatom (O^{γ}) des Serins (Ser96) in Richtung Substrat ausgerichtet. Der N- und C-Terminus der Phytase liegen frei und befinden sich auf Seiten der α/β -Domäne.

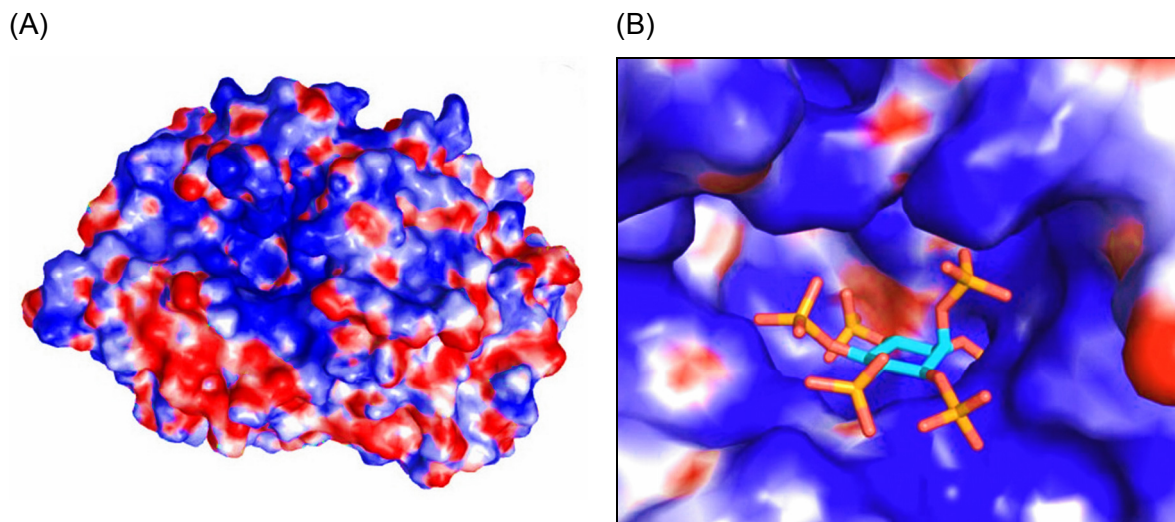


Abbildung 18: Elektrostatisches Potential der *Klebsiella*-Phytase (A) und des aktiven Zentrums mit Phytat (B) (Abbildung nach Kerstin Böhm). Das Potential wurde mit APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Server) in einem Bereich von -10 (rot) bis +10 kT (blau) kalkuliert. In Abbildung (A) ist das Phytasemolekül mit Blick in das katalytische Zentrum dargestellt. Im und um das aktive Zentrum ist eine positive Ladung, verdeutlicht durch die blaue Färbung, zu erkennen. In Abbildung (B) ist das aktive Zentrum mit Phytat (Bindungsmodell) zu erkennen. Der 3'-Phosphatrest des Phytats ragt in die katalytische Tasche. Um das Phytat befinden sich fast ausschließlich zahlreiche positiv geladene Reste.

2.2.3. Modellierung der Substratbindung

Mit Hilfe der Kristalle aus dem „Microbatch“-PEG-Kristallisationsansatz, in dem sich neben 3 mM Phytat auch Ammoniumsulfat als Präzipitat befand, wurde die Kristallstruktur der *Klebsiella*-Phytase ebenfalls erfolgreich gelöst. Die kristallographische Untereinheit bestand aus je vier Molekülen, in deren aktiven Zentren jeweils, neben den Elektronendichten der Phosphatreste, auch je zwei weitere Elektronendichten sichtbar waren. Hierbei könnte es sich aber aufgrund des großen Überschusses (53 fach), um zwei Sulfatreste gehandelt haben. Die Elektronendichten der Sulfatreste und der Phosphatreste sind nur schwer zu unterscheiden. Mit Hilfe dieser zwei weiteren Elektronendichten und des Phosphat- oder Sulfatrestes im aktiven Zentrum war es aber möglich, das Phytat in das aktive Zentrum zu modellieren. Die vier Moleküle zeigten eine annähernd identische Konformation. Dabei bewirkten die Bindungen von Sulfat- bzw.

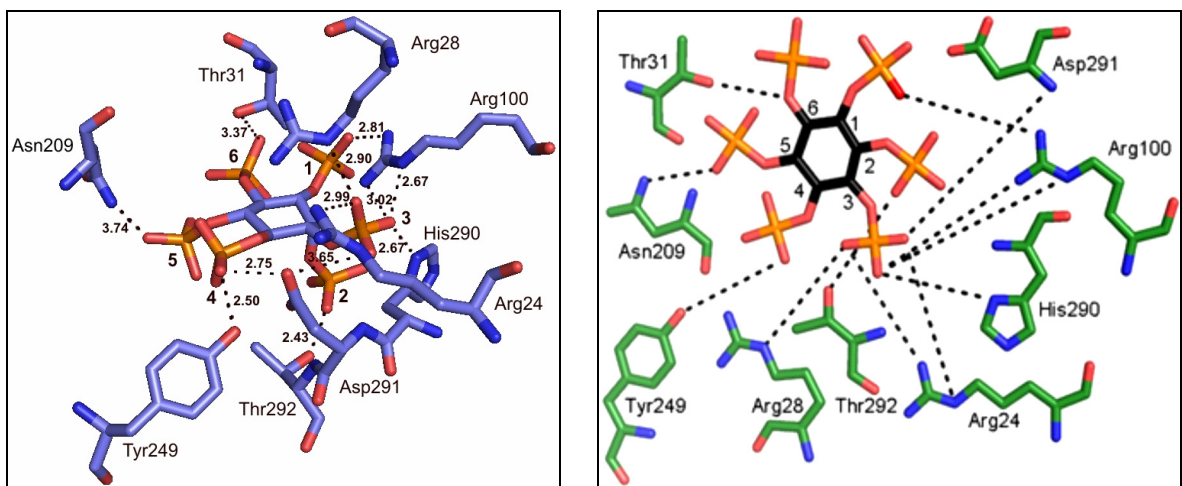


Abbildung 19: Links: Bindung des Phytats mit H-Brücken und Bindungslängen in Å (Pymol 0.99). Rechts: Abbildung nach Kerstin Böhm. Schematisches Modell der Phytatbindung in der *Klebsiella*-Phytase mit H-Brücken. Die Modellierung der Phytatbindung erfolgte mit Sulfat oder Phosphat-Elektronendichten. Über die 1-, 3- und 4- Phosphatreste wurden Wasserstoffbrückenbindungen, die die Phytatbindung fixieren könnten, identifiziert. Das Phytat lag mit dem 3-Phosphatrest in der katalytischen Tasche und wurde durch sechs H-Brücken fixiert und koordiniert. Die weiteren Phosphatreste wurden vermutlich durch mindestens eine H-Brücke fixiert.

2.3. Mutagenesen der *Klebsiella*-Phytase

Die Phytasen aus *E. coli* und *Klebsiella* besitzen große strukturelle Ähnlichkeiten, unterscheiden sich aber stark in den Aktivitäten. Deshalb war es von Interesse, Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der Substratbindung aufzuzeigen. Es sollten wichtige Aminosäurereste, die bei der Substratbindung und Katalyse der *Klebsiella*-Phytase von Bedeutung sind, lokalisiert werden. Dies sollte letztlich Aufschluss über die vergleichsweise geringere spezifische Phytaseaktivität der *Klebsiella*-Phytase bringen. Die Grundlage hierfür stellte das Proteinalignment der *E. coli*-Phytase, der *Klebsiella*-Phytase und anderer saurer Phosphatasen (Abbildung 60) sowie der strukturelle Vergleich zwischen *E. coli*- und *Klebsiella*-Phytase dar. Die Modellierungsdaten der Phytatbindung standen zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung. Basierend auf dem Proteinalignment und dem Vergleich der Strukturen konnten konservierte Reste, ähnliche Bereiche, aber auch Unterschiede, in Ladung und Position von Aminosäureresten, im Molekül lokalisiert werden. Es erfolgten gezielt Mutationen, die diese Unterschiede näher charakterisieren sollten. Zuerst wurden Random-Punkt-Mutagenesen (RP) unter Verwendung von Random-Primern durchgeführt und anschließend gezielt Punktmutationen in wichtigen Bereichen des Phytasemoleküls gesetzt.

2.3.1. Random-Punkt-Mutagenese (RP-Mutagenese) der Phytase

Die RP-Mutagenesen wurden zur Identifizierung von aktiven Phytaseklonen durchgeführt. An den gekennzeichneten Bereichen (Abbildung 20) wurden Aminosäurereste randomisiert. Die Mutationen wurden durch degenerierte Primer erzeugt. Dabei wurde in den Random-Primern jede Basenkombination zugelassen. Die in der in Abbildung 20 gekennzeichneten Bereiche wurden je nach Position der Mutation, ein bis vier Aminosäurereste ‚randomisiert‘. Diese RP-Mutationen wurden mittels SOE-PCR in das Gen eingeführt. Nach Klonierung der mutierten Phytasegene in den pFlag-His-Plasmidvektor erfolgte die Expression der Gene im BL21*phoB*-Stamm mittels IPTG-Induktion im Phytasemedium. Insgesamt wurden zehn RP-Mutagenesen (RP1-RP10) durchgeführt (Tabelle 7).

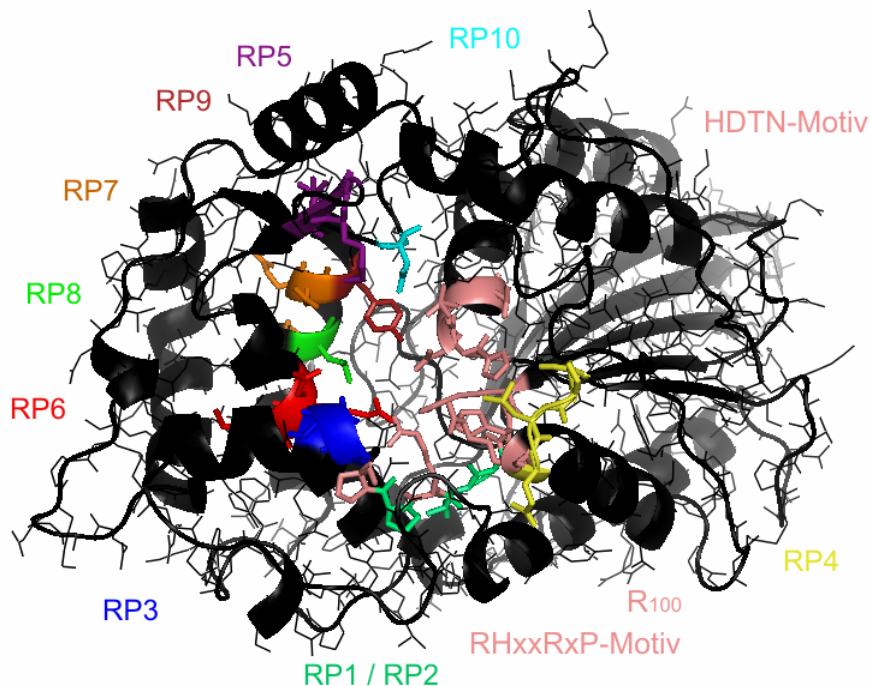


Abbildung 20: Übersicht über die Random-Punkt-Mutagenesebereiche. Die Abbildung zeigt die Struktur des *Klebsiella*-Phytasemoleküls. Zentral befindet sich das aktive Zentrum mit den konservierten Resten, aus dem RHGxRxP-Motiv (Arg24, His25, Gly26, Arg28, Pro30) dem HDTN-Motiv (His290, Asp291, Thr292, Asn293) und einem weiteren konservierten Argininrest (R100). Verschieden farbig sind die Bereiche der 10 RP-Mutagenesen dargestellt. Die Mutagenesen RP1/RP2 veränderten die variablen AS-Reste zwischen den konservierten Aminosäureresten des RHGxRxP-Motivs. Dies waren ein Glycinrest (Gly26), Isoleucinrest (Ile27) und ein Prolinrest (Pro29), welche wahrscheinlich für die Koordinierung der Argininreste und des Histidinrestes im RHGxRxP-Motiv verantwortlich sind. RP3 umfasste die Mutagenese von drei Resten, einem Alanin (Ala32), Glycin (Gly33) und Asparagin (Asn34). Diese befanden sich in der Proteinkette direkt nach dem RHGxRxP-Motiv. RP4 umfasste vier Aminosäurereste in Folge. Diese Aminosäurereste, ein Serinrest (Ser96), Prolinrest (Pro97), Leucinrest (Leu98) und Glutaminrest (Gln99) befanden sich direkt vor dem konservierten Argininrest (Arg100) und trugen ebenfalls zur Stabilisierung und Koordinierung des aktiven Zentrums bei. Die drei mutagenisierten Reste der RP-Mutagenese 5 (RP5) befanden sich gegenüber dem aktiven Histidinrest, seitlich im aktiven Zentrum. Es wurden ein Glycinrest (Gly197), ein Lysinrest (Lys198) und eine Threoninrest (Thr199) mutagenisiert. Die vier Reste des Bereichs der Mutagenese 6 (RP6) befanden sich in unmittelbarer Umgebung zu den Resten der Mutagenese RP3. Jedoch lagen diese Aminosäurereste auf einer anderen α -Helix. Betroffen waren dabei ein Asparaginrest (Asn209), Methioninrest (Met210), Valinrest (Val211) und ein Glutamatrest (Glu212). Die RP-Mutagenesen RP7-RP10 umfassten Mutationen der Aminosäurereste am „Boden“ des aktiven Zentrums. Die Mutagenese RP7 veränderte die drei Reste, den Prolinrest (Pro243), den Glutamatrest (Glu247) und den Asparaginrest (Asn248). Zuvor wurden der Leucinrest (Leu245) zu Histidin und Threonin (Thr246) zu Asparagin mutagenisiert. Für RP8, RP9 und RP10 wurde je ein Rest mutagenisiert. Dies waren bei RP8 der Leucinrest (Leu245), bei RP9 der Tyrosinrest (Tyr249) und bei RP10 der Asparaginrest (Asn253).

2.3.1.1. Screening nach Phytasemutanten der RP-Mutagenesen

Im Screening-Test wurde das Wachstum von BL21phoB-Transformanten des pFlag-Expressionsplasmids, welches das mutierte Phytasegen beinhaltete, untersucht. Dies erfolgte im Phytatmedium und unter Phosphatlimitation. Der Wachstumstest beruht auf einem von Dr. Heike Strobel (EUCODIS GmbH) entwickelten System (Strobel, 2006).

Dabei sollten nur Klone wachsen, die durch die IPTG-induzierte Expression einer aktiven Phytase und der damit verbundenen hydrolytischen Spaltung des Phytats, ausreichend Phosphat für den Wachstumsprozess mobilisieren konnten. Es wurden stets Klone, die eine funktionelle Phytase überexprimierten als Positivkontrolle und auch Klone, die keine Expression zeigten, als Negativkontrolle zum Vergleich des Zellwachstums mitgeführt (Abbildung 21a). Das Wachstum der Kulturen wurde direkt mittels OD₆₀₀-Messung bestimmt und durch Scannen der Kulturplatte dokumentiert (Abbildung 21b). Die Stringenz des Tests konnte durch das Variieren der Phytatkonzentration im Medium beeinflusst werden. Bei geringen Phytatkonzentrationen (0,065 mM) zeigten nur Klone bei Expression einer Phytase mit hohen spezifischen Aktivitäten ein Wachstum. Im Verlauf der Arbeiten wurden zahlreiche Mutanten der zehn Random-Punkt-Mutagenesen identifiziert und mittels Sequenzierung nachgewiesen (Tabelle 7). Es wurden ausgewählte aktive Phytasemutanten gereinigt und danach erfolgte die Charakterisierung dieser mutagenisierten Enzyme (siehe Kapitel 2.3.1.2) durch Bestimmungen der Phytase- und Phosphataseaktivitäten (Abbildung 22).

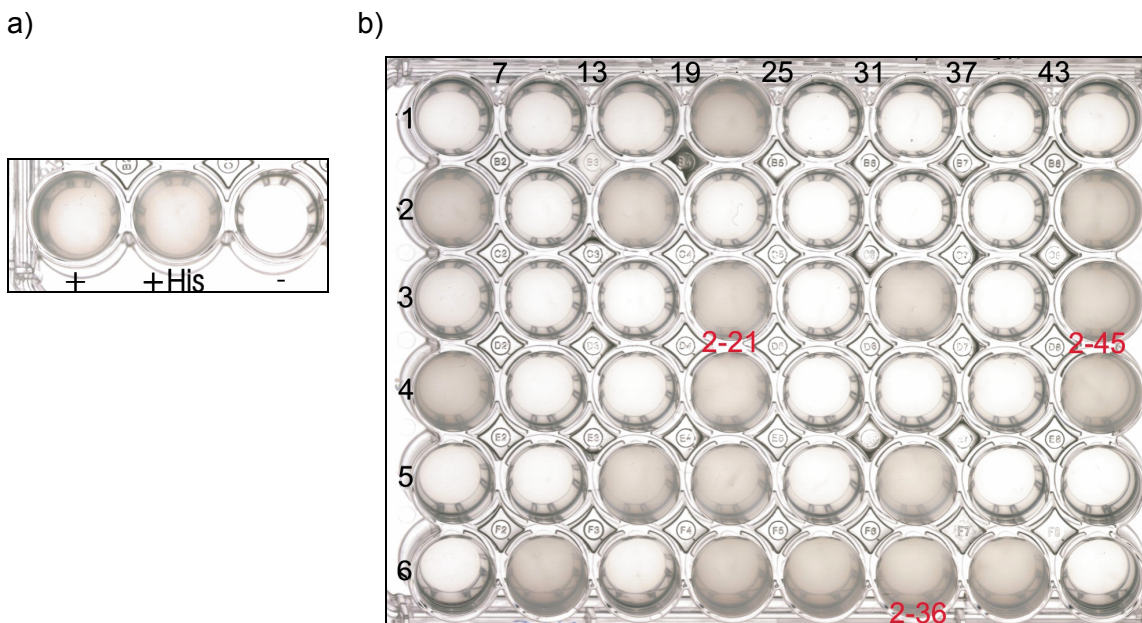


Abbildung 21: Die Abbildungen zeigen drei Wells (a) und eine 48-Well-Phytat-Screening-Platte (b). Jedes Well wurde mit 1 ml Phytatmedium (steril) befüllt und mit 10 µl der LB-Vorkulturen jedes BL21phoB-Klones beimpft. Die Wells wurden verschlossen und für 18 h bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. In Abbildung a) sind die positiv und negativ Kontrollen gezeigt. Die beiden Positivkontrollen (+ und +His) waren Klone, die die native *Klebsiella*-Phytase nach IPTG-Induktion mit Flag-tag (+) und His-tag (+His) exprimierten. Sie zeigten ein deutliches Wachstum nach Inkubation. Die Negativkontrolle, ein Klon mit einem leeren Expressionsplasmidvektor, zeigte kein Wachstum im Phytatmedium. Dies wurde an der fehlenden Trübung (dunkelgrau) sichtbar. In Abbildung b) ist eine inkubierte (18 h, 37 °C 100 rpm) Phytat-Screening-Platte mit 48 Klonen der RP-Mutagenese 2 (RP2) dargestellt. Sichtbar wurden die unterschiedlichen Trübungen der Wells (graue Färbung). Die Trübungen zeigten das unterschiedlich starke Wachstum der Klone an. Die rot gekennzeichneten Klone (2-21, 2-36 und 2-45) stellten Klone mit einem positiven Wachstum dar. Aus diesen Klonen wurden die Phytase-Proteine isoliert und charakterisiert.

In Tabelle 7 ist die Anzahl der im Phytatmedium getesteten Klone der jeweiligen RP-Mutationen dargestellt. Weiterhin ist die Zahl der positiven Klone, der untersuchten Klone und der tatsächlichen mutierten Klone aufgelistet. Als positive Klone werden diejenigen bezeichnet, die ein besseres Wachstum als die Negativkontrolle zeigten. Es wurden ausschließlich die Phytasegene der positiven Klone sequenziert. Insgesamt wurden im Verlauf der Arbeit ca. 1800 Klone getestet.

2.3.1.2. Charakterisierung einiger RP-Mutanten

Durch die Random-Punkt-Mutagenese wurden vorrangig Bereiche der Phytase, welche vermutlich für die Bindung des Substrates eine Rolle spielen, mutagenisiert. Es sollten Zusammenhänge zwischen der Position der Mutationen, Art der Mutationen und den spezifischen Aktivitäten der Mutanten aufgezeigt werden. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurden weitere gezielte Punktmutationen (PM) durchgeführt.

Tabelle 7: Auswertung der Random-Punkt-Mutagenesen (RP1-RP10)

Random-Mutagenese	Zahl der Klone	Mutationen	Klone (positiv im Test); (untersucht); (mutiert)	Mutanten untersucht	Sequenz
RP1	203	RHGIRPPT (Gly26,Iso27,Pro29)	(14);(14);(14)	RP1-25 RP1-65	RHASRGPT RHASRPPT
RP2	208	RHGIRPPT (Iso27,Pro29)	(73); (22); (6)	RP2-21 RP2-45 RP2-36	RHGVRSPT RHGIRGPT RHGTRSPT
RP3	159	HGIRPPT AGNR (Ala32, Gly33, Asn34)	(65); (13); (13)	RP3-2 RP3-4 RP3-7 RP3-19 RP3-65	HGIRPPT VQRR HGIRPPT ISTR HGIRPPT LYSR HGIRPPT ITGR HGIRPPT DPTR
RP4	337	RASPLQ RTR (Ser96, Pro97, Leu98,Gln99)	(72); (32); (2)	RP4-68 RP4-135	RADPLNRTR RARQLQRTR
RP5	86	SK SGKT TISG (Gly197, Lys198, Thr199)	(70); (13); (13)	RP5-14 RP5-22 RP5-38	SKSLAITISG SKSRP ST ISG SKSTYP T ISG
RP6	326	MAN MVET LR (Asn209, Met210, Val211, Glu212)	(75); (20); (3)	RP6-112 RP6-161 RP6-186	MALDFVTLR MALLTETLR MADFIETLR
RP7	135	LPLH VENYD (Pro243, Glu247, Asn248)	(13); (9); (9)	RP7-65 RP7-67 RP7-107	LPLH N PPYD LILH N SLYD LRLH N LSYD
RP8	135	ALLPLL TEN (Leu245)	(100); (6); (5)	RP8-31 RP8-40 RP8-91	ALLPLV TEN ALLPLR TEN ALLPLH TEN
RP9	135	PLL TENY DLSN (Tyr249)	(73); (5); (5)	RP9-5 RP9-31 RP9-52	PLL TENH DLSN PLL TENV DLSN PLL TENN DLSN
RP10	135	TENYDLS NDV (Asn253)	(80); (8); (8)	RP10-1 RP10-54 RP10-66 RP10-74	TENYDLS LDV TENYDLS YDV TENYDLS VDV TENYDLS ADV

In der Tabelle 7 und in Abbildung 22 sind die getesteten Phytasemutanten und die spezifischen Phytase- und Phosphataseaktivitäten dargestellt. Das kleinere Substratmolekül, para-Nitrophenylphosphat (pNPP), besitzt nur einen abspaltbaren Phosphatrest an einen Phenolring. Aufgrund der nur geringen partiell negativen Ladung des Phenolrings wechselwirkt das Substrat im Gegensatz zum Phytat vermutlich mit anderen Resten im aktiven Zentrum. Letztlich wird der zu spaltende Phosphatrest im aktiven Zentrum aber in gleicher Weise wie die Phosphatreste des Phytats fixiert. Die Phosphataseaktivitäten (Abbildung 22) wurden bestimmt, um Hinweise auf mögliche Einflüsse der Mutationen auf die AS-Reste, die für die Bindung des zu spaltenden Phosphatrestes verantwortlich sind, zu erhalten. Bei einer veränderten Bindung dieses Phosphatrestes durch eine Mutation, sollten die Phytase- und Phosphataseaktivitäten im gleichen Maße beeinflusst werden. Unterschiedliche Aktivitätsänderungen lieferten so Hinweise auf ein verändertes Substratspektrum der Phytasemutanten, oder wiesen direkt auf eine Beeinflussung der Phytatbindung hin. Dies sollte zur Identifizierung von Bindungsstellen führen.

Nach den RP-Mutagenesen 4 (RP4) und 6 (RP6) wurden jeweils mehr als 300 Klone dem Screening-Test unterzogen. Bei etwa 20 % der untersuchten Klone zeigte sich ein deutlich besseres Wachstum im Vergleich zur Negativkontrolle. Es wurden jedoch keine Klone ermittelt, die ein besseres Wachstum als die Positivkontrolle zeigten. Die Mutationsrate war bei diesen beiden RP-Mutationen sehr gering. Die untersuchten RP6-Phytasemutanten waren nicht aktiv (Daten nicht gezeigt). Anhand der modellierten Phytatbindung war ein Einfluss des mutagenisierten Asparaginrests (Asn209) auf die Phytatbindung zu vermuten, der durch die Mutagenese der benachbarten AS verstärkt wurde.

Für die Mutante RP4-68 konnte eine spezifische Phytaseaktivität von ca. 140 U/mg und eine mit 2,7 U/mg sehr geringe Phosphataseaktivität ermittelt werden. Der Aktivitätsverlust durch den Austausch des SPLQ-Motivs (Ser96, Pro97, Leu98, Glu99) zu einem DPLN-Motiv konnte auf den Serin-Austausch und damit auf das Fehlen einer H-Brücke zum His290 zurückgeführt werden. Da beide Aktivitäten stark verringert wurden, wies dies auf eine schlechtere Bindung des Phosphatrestes im aktiven Zentrum hin. Nach den RP-Mutagenesen 1 (RP1) und 7 (RP7) wurden nur wenige positive Klone ermittelt. Jeweils weniger als 10 % der Klone waren, trotz einer sehr hohen Mutationsrate, im Test positiv. Dies war ein Indiz für eine starke Beeinflussung der Phytaseaktivität durch Mutationen an den beschriebenen Stellen. Vor allem die Mutation des Glycinrestes (Gly26), welcher unter den Phytasen, aber nicht unter den Phosphatasen, konserviert ist und in direkter Nachbarschaft zum aktiven Histidinrest (His25) steht, führte hier zu einem starken Aktivitätsverlust. Die entsprechenden Phytasemutanten RP1-25 und RP1-65

zeigten keine Enzymaktivitäten. Aber auch durch Mutationen des Isoleucinrestes (Iso27) und des Prolinrestes (Pro29) verringerten sich die Phytaseaktivitäten stark (RP2). Der Anteil an positiven Klonen der RP-Mutagenese 2 war zwar mit 73 Klonen deutlich höher, aber neben den sechs charakterisierten Mutanten war hier eine hohe Anzahl (14) an Enzymen zu verzeichnen, die keine Substitutionen der beiden AS-Reste aufwiesen. Dies deutet ebenfalls auf zwei Mutationspunkte hin, die stark auf die Aktivität der Phytase wirkten. Für die untersuchten Mutanten RP2-21 (ca. 57 U/mg), RP2-36 (45 U/mg) und RP2-45 (92 U/mg) wurden spezifische Phytaseaktivitäten zwischen 45 - 92 U/mg (14,9 - 24,1 %) bestimmt. Der Austausch des Prolinrestes zu Glycin (RP2-45) führte zu einem drastischen Aktivitätsverlust. Bei dem zusätzlichen Austausch des hydrophoben Isoleucinrestes zu einem hydrophoben Valinrest (RP2-21) oder einem polaren und reaktiven Threoninrest (RP2-36) sank die Phytaseaktivität nochmals um 50 %.

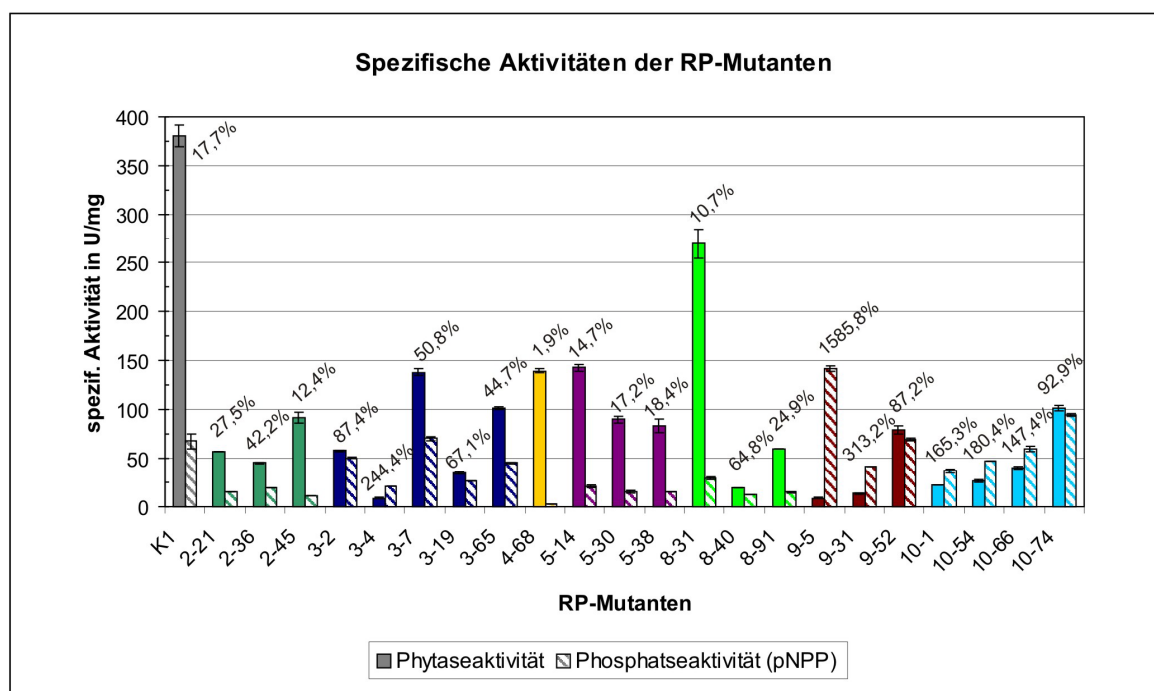


Abbildung 22: Spezifische Aktivitäten der Random-Punkt-Mutanten (RP-Mutanten). In der Abbildung sind die spezifischen Phytase- und Phosphataseaktivitäten einzelner RP-Phytasemutanten mit den Standardabweichungen dargestellt. Die Phytaseaktivitäten sind durch farbige (entsprechend der RP-Mutation) Balken und die Phosphataseaktivitäten sind mit farbig gestreiften Balken (entsprechend der RP-Mutation) verdeutlicht. Prozentual sind die Werte der pNPP-Aktivitäten dargestellt. Die Bestimmungen erfolgten mit einer Substratkonzentration von 5 mM Phytat und 5 mM pNPP bei 37 °C und wurden in Dreifachbestimmungen für Phytat und in Zweifachbestimmungen für pNPP ermittelt. Die Enzymverdünnungen wurden mit 0,15 % BSA hergestellt.

Die fünf Aminosäuremutationen der RP-Mutagenese 7 (RP7) resultierten in einem starken Aktivitätsverlust der Phytase, so dass nur wenige Klone ein geringes Wachstum im Test zeigten. Die isolierten Mutanten RP7-65, RP7-67 und RP7-107 waren inaktiv, oder zeigten nur sehr geringe, nicht messbare Aktivitäten.

Die übrigen mutierten Bereiche oder Reste der Mutationen RP3, RP5, RP8, RP9 und RP10 schienen, durch die relativ hohe Zahl an positiven Klonen begründet, einen schwächeren Einfluss auf die Aktivität der Phytase auszuüben.

In der RP-Mutagenese 3 (RP3) wurde die Aminosäuresequenz eines seitlichen Bereiches des aktiven Zentrums (Abbildung 20), wie auch im Alignment zu sehen, verändert. Der Aktivitätsverlust durch die Mutationen schien relativ gering zu sein, da etwa 50 % aller Klone ein positives Wachstum zeigten. Die Mutationsrate lag bei 100 %. Alle sequenzierten Phytasegene wiesen verschiedene Mutationen auf. Die untersuchten Phytasemutanten RP3-2, RP3-4, RP3-7, RP3-19 und RP3-65 zeigten deutliche Unterschiede in den spezifischen Phytase- und Phosphataseaktivitäten. Dabei wurden Phytaseaktivitäten zwischen 8 - 140 U/mg (2,3 - 26,6 %) ermittelt. Ein sehr starker Phytaseaktivitätsverlust wurde verzeichnet, wenn an Stelle des Alanin-, Glycin- und Asparaginrestes (Ala32, Gly33, Asn34) ein Isoleucin-, Serin- und Threoninrest (IST) (RP3-4), in die Phytase eingebaut wurde. Die Phosphataseaktivität verringerte sich nur um ca. 30 %. Bei den anderen Mutanten waren ähnliche Effekte, bei denen die Phytaseaktivitäten teilweise stark absanken und die Phosphataseaktivitäten etwa gleich blieben, zu verzeichnen. Diese starken Auswirkungen auf die Phytaseaktivität bewirkte der Einbau des Isoleucins für Alanin. Die Mutante RP3-19 hatte ebenfalls eine geringe Phytaseaktivität von ca. 34 U/mg (9,1 %). Der Einfluss auf die Aktivitäten nach dem Einbau von Threonin in der zweiten oder dritten Mutationsposition, war stark von den Eigenschaften der benachbarten Aminosäuren abhängig. Dies spiegelten die starken Aktivitätsunterschiede der Mutanten RP3-4 und RP3-65 wider. Die drei Mutanten, die eine Substitution des Alanins zu Valin (RP3-2), Leucin (RP3-7) oder Asparaginsäure (RP3-65) aufwiesen, zeigten spezifische Phytaseaktivitäten von 58 U/mg (RP3-2), 138 U/mg (RP3-7) und 100 U/mg (RP3-65). Die Phosphataseaktivitäten dieser Mutanten waren mit der Aktivität der nativen Phytase vergleichbar (48 - 70 U/mg). Die drei Enzyme der RP-Mutagenese 3 besaßen somit im Vergleich zu den Phytaseaktivitäten hohe Phosphataseaktivitäten. Dies ließ sowohl auf eine unveränderte oder bessere Bindung des pNPPs aber auch auf eine schlechtere Bindung des Phytats schließen.

Durch die RP-Mutation 5 (RP5) wurden ein Lysinrest (Lys198), der in das aktive Zentrum hineinragte, sowie die beiden benachbarten Aminosäurereste (Gly197, Thr199) ausgetauscht. Es wurden mit 86 Klonen nur vergleichsweise wenige Klone getestet, da bereits über 80 % dieser untersuchten Klone ein positives Wachstum zeigten. Alle sequenzierten Phytasegene besaßen unterschiedliche Mutationen in den drei beschriebenen Positionen. Die drei untersuchten Phytasemutanten besaßen spezifische Phytaseaktivitäten von 83 U/mg (RP5-38), 89 U/mg (RP5-30) und 140 U/mg (RP5-14). Bei Austausch des basischen und damit positiv geladenen Lysinrestes, zu einem

hydrophoben Alanin, Prolin und einem stark polaren Tyrosinrest, fielen die Aktivitäten um 60 - 80 %. Dabei war der Aktivitätsverlust nach dem Einbau eines Alaninrestes am geringsten. Ein positiv geladener Rest in der beschriebenen Position unterstützt vermutlich die Bindung des Phytats. Das jeweilige Verhältnis von Phytaseaktivität zur Phosphataseaktivität blieb bei allen drei Mutanten konstant. Die Phosphataseaktivitäten sanken also ebenfalls auf 15 - 20 U/mg ab.

Etwa 50 - 75 % der getesteten Klone der Mutagenesen RP8, RP9 und RP10 zeigten ein positives Wachstum im Phytatmedium. Der Austausch von jeweils einer Aminosäure in den gewählten Bereichen der Phytase führte zu einer 100%igen Mutationsrate und zu einer hohen Zahl an aktiven Phytasemutanten. Die spezifische Phytaseaktivität der Phytasemutante RP8-31 verringerte sich um 30 % auf 270 U/mg durch Einbau von Valin an Stelle des Leucinrestes (Leu245). Bei Einbau eines Histidin- oder Argininrest führte dies sogar zu einem Aktivitätsverlust von 85-95 % (RP8-40 (19 U/mg), RP8-91 (60 U/mg)). Der Austausch zu einer basischen Aminosäure bewirkte zudem einen starken Abfall der Phosphataseaktivitäten.

Eine Substitution des Tyrosinrestes (Tyr249) durch einen hydrophoben Valin-Rest (RP9-31) oder einen Histidinrest (RP9-5) führte zu einem starken Verlust der Phytaseaktivität. Die Werte der spezifischen Phytaseaktivitäten dieser beiden Mutanten wurden mit ca. 10 U/mg bestimmt. Die Phosphataseaktivität der RP9-31-Mutante fiel gering auf 42 U/mg ab. Hingegen stieg die Aktivität der RP9-5-Mutante deutlich auf 141 U/mg an. Der Austausch zu Asparagin (RP9-52) resultierte in einem starken Phytaseaktivitätsverlust von 80% bei gleicher Phosphataseaktivität.

Die Mutation des Asparaginrestes (Asn253) führte ähnlich wie bei RP-Mutation 9 zu einem starken Phytaseaktivitätsverlust aber auch zu stabilen, teils erhöhten, Phosphataseaktivitäten (RP10). Die Phytaseaktivitäten sanken auf 12 U/mg und 40 U/mg ab, wenn der Asparaginrest (RP10) durch einen hydrophoben Leucin- (RP10-1) oder Valinrest (RP10-66) ersetzt wurde. Der Einbau der aromatischen Aminosäure Tyrosin (RP10-54) bewirkte ebenfalls eine starke Reduktion der Phytaseaktivität auf 26 U/mg. Durch die Substitution zu einem Alaninrest (RP10-74) sank die Aktivität nur auf 102 U/mg. Die längere hydrophobe Seitenkette beeinflusste demnach deutlich die Phytaseaktivität. Die Phosphataseaktivitäten der Mutanten RP10-1 und RP10-66 fielen nur geringfügig (37 U/mg und 60 U/mg). Für die Mutante RP10-74 war hingegen eine Erhöhung der Phosphataseaktivität auf 94 U/mg zu verzeichnen. Ein Aminosäurerest mit kurzer hydrophober Seitenkette begünstigte anscheinend die Bindung des pNPPs. Die Tyrosinseitenkette (RP10-54) beeinflusste die Phosphataseaktivität kaum, was die Aktivität von 47 U/mg zeigte.

2.3.2. Die Punktmutationsanalysen der *Klebsiella*-Phytase

Die Untersuchungen der durch Random-Punkt-Mutagenese (RP) erzeugten Mutanten und die modellierte Substratbindung stellten wichtige Grundlagen für gezielte Punktmutationen (PM) dar. Ein Ziel war es, möglichst aktivere Mutanten zu erzeugen. Parallel dazu wurde versucht, inaktive Mutanten oder Mutanten mit veränderten Substratspezifitäten zu erzeugen, um auch so Aminosäuren zu identifizieren, die mit dem Substrat (Phytat oder pNPP) interagieren. Es wurden insgesamt 24 Punktmutationen erzeugt und nach der Reinigung der Phytasen charakterisiert. Die wichtigsten Mutationspunkte im *Klebsiella*-Phytasemolekül befanden sich in den Regionen, durch die, neben den konservierten Resten des RHGxRxP-Motivs, des Argininrestes (Arg100) und des HD-Motivs, vermutlich auch eine Substratbindung erfolgt. Weiterhin wurden Aminosäurereste mit exponierten Positionen an den Randzonen des aktiven Zentrums mutagenisiert (Abbildung 23). Aufgrund der starken strukturellen Ähnlichkeit zu der *E. coli*-Phytase wurde bei den PM-Mutanten PM1-PM3 das aktive Zentrum der *Klebsiella*-Phytase zu dem aktiven Zentrum der *E. coli*-Phytase verändert. In der Phytase PM1 wurden die Aminosäuren 14 bis 32 (QLEKVVELSRHGIRPPTA zu QLESVVIVSRHGVRAPTA) ersetzt.

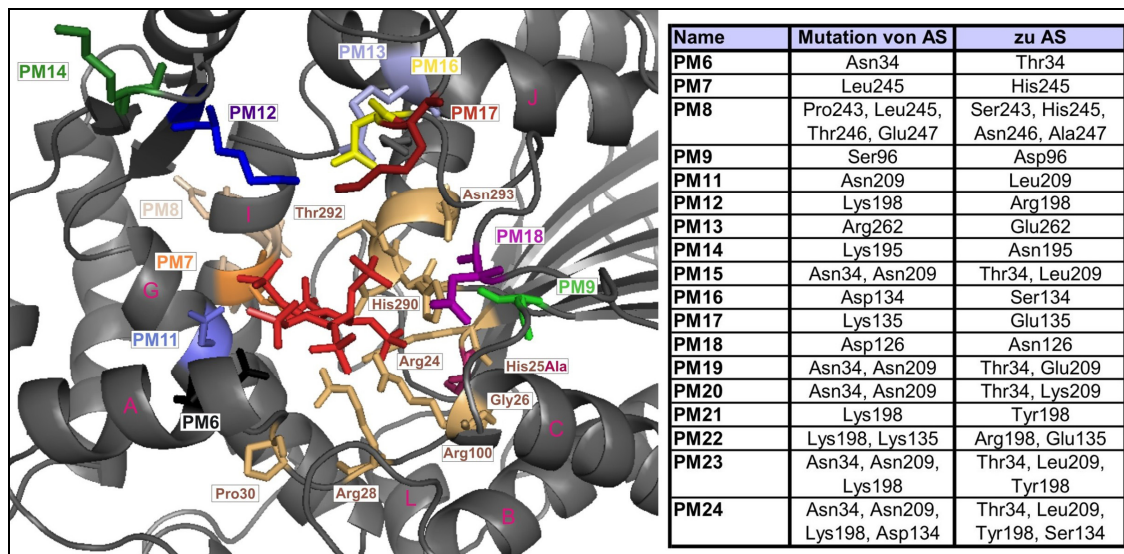


Abbildung 23: Überblick über die Punktmutationen (PM). Links sind das aktive Zentrum der Phytasemutante Kleb-M1 (His25Ala) mit den konservierten Resten (beige) und dem gebundenen Phytat sowie die Bereiche der Mutationen (farbig) dargestellt. Das Phytat liegt mit dem 3-Phosphatrest in der Bindungstasche. In der Tabelle (rechts) sind die Punktmutationen und der entsprechende Aminosäureaustausch aufgelistet.

Die Mutante PM2 wies eine Mutation des Prolinrestes Pro29 zu Alanin (Ala29) auf. In PM3 wurde der Isoleucinrest, Iso26, zu Valin (Val26) und wie in PM2 der Prolinrest, Pro29, zu Alanin (Ala29) des RHGIRPP-Motivs verändert. In der Mutante PM4 wurden die Aminosäurereste vor dem aktiven Histidinrest (His25) verändert. Das Proteinmotiv QLEKVVEL (Gln15 bis Leu22) wurde entsprechend dem *E. coli*-Phytasemotiv zu

QLESVVIV angepasst. Die Mutation PM5 umfasste einen Aminosäureaustausch von Leu98 zu Asp98 im SPLQ-Motiv.

2.3.2.1. Charakterisierung der Punktmutationen (PM)

Die erzeugten PM-Mutanten wurden bezüglich der spezifischen Phytase- und Phosphataseaktivitäten untersucht. Weiterhin wurden die Temperaturprofile, pH-Profile, Thermostabilitäten und pH-Stabilitäten einiger ausgewählter Mutanten ermittelt. Die kinetischen Parameter, K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m , wurden ebenfalls von einigen Mutanten bestimmt.

Die spezifischen Phytase- und Phosphataseaktivitäten der PM-Mutanten

Die spezifischen Aktivitäten der PM-Mutanten wurden im Standard-Phytasetest und Standard-Phosphatasetest bestimmt.

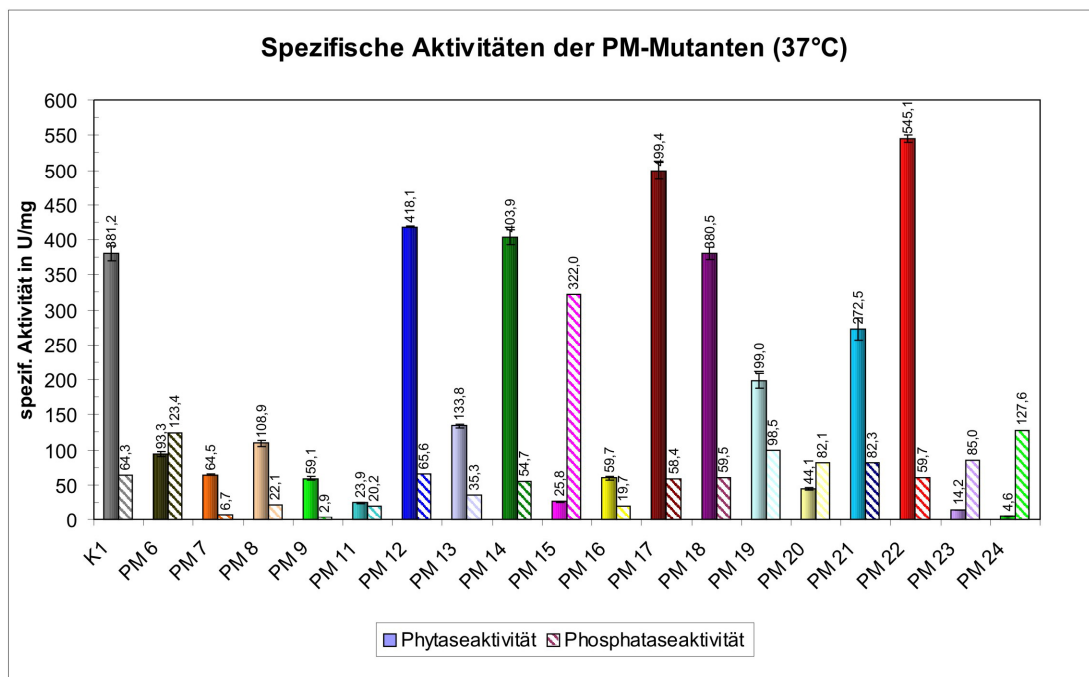


Abbildung 24: Spezifische Phytase- und Phosphataseaktivitäten einiger Punktmutation-Mutanten (PM-Mutanten). Dargestellt sind die spezifischen Aktivitäten der Punktmutations-Mutanten (PM). Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten bei 37 °C für 10 min mit 5 mM Na-Phytat, 5 mM pNPP und in mindestens Dreifachbestimmungen. Die Enzyme wurden in 0,15 % BSA verdünnt. Die Messwerte der spezifischen Phytaseaktivitäten sind durch farbige Balken und die Phosphataseaktivitäten (pNPP) durch Balken mit farbigen Querstreifen dargestellt. Zusätzlich sind die Standardabweichungen (Stawn) ersichtlich.

Die Mutanten PM1-PM4 zeigten sehr geringe spezifische Phytase- und Phosphataseaktivitäten. Die Substitutionen von fünf Aminosäureresten um und im aktiven Zentrum (PM1) bewirkten einen sehr starken Aktivitätsverlust. Die Mutante PM1 besaß eine spezifische Phytaseaktivität von 11,62 U/mg und Phosphataseaktivität von 0,58 U/mg. Die Phytasemutanten PM2 und PM3, bei denen nur ein bzw. zwei Reste des RHGIRPP-

Motivs mutiert wurden, wiesen Phytaseaktivitäten von 23,12 U/mg und 68,16 U/mg auf. Ermittelt wurden Phosphataseaktivitäten von 8,25 U/mg und 2,88 U/mg. Die Mutante PM4 hatte mit 10,18 U/mg eine sehr geringe Phytaseaktivität und ebenfalls eine geringe Phosphataseaktivität von 0,67 U/mg.

Der Austausch des Leu98 zu Asp98 bewirkte einen vollständigen Aktivitätsverlust (PM5). Die Doppelmutanten (PM2-PM5, PM2-PM6, PM3-PM5, PM3-PM6, PM4-PM6), die Kombinationen der beschriebenen fünf Mutationen (PM2 bis PM6) darstellten, zeigten ebenfalls diese starken Aktivitätsverluste.

Die untersuchten Mutanten der Random-Mutagenese RP3 zeigten, dass die Aktivitäten sehr unterschiedlich waren. Gleichzeitig wurden „random“ viele aktive Mutanten mit verschiedenen Substitutionen erzeugt. Durch die PM6-Mutante sollte der Einfluss des Asparaginrestes, Asn34, auf die Substratbindung untersucht werden. Der Asparaginrest (Asn34) wurde gegen einen Threoninrest ausgetauscht. Dies bewirkte eine starke Verringerung der Phytaseaktivität auf ca. 93 U/mg, aber gleichzeitig eine Erhöhung der Phosphataseaktivität auf 123 U/mg. Für diese Aktivitätsveränderungen könnten die reaktive OH-Gruppe des Threonins, das Fehlen der Aminogruppe des Asparaginrestes oder sterische Wechselwirkungen verantwortlich sein, die dann zu einer besseren Bindung des pNPPs führten. Eine zusätzliche Mutation Asn209Leu (PM15) verstärkte die beschriebenen Aktivitätsveränderungen. Dieser Rest befand sich in der α -Helix G und bildet vermutlich ein Phosphatrest des Phytat über eine H-Brücke. Die RP6-Mutanten haben gezeigt, dass durch die Mutation dieses Asparaginrestes (Asn209) und der drei folgenden Reste die Phytaseaktivität auf 25 U/mg fiel und die Phosphataseaktivität stark auf 322 U/mg anstieg. Durch den Aminosäureaustausch wird anscheinend die Substratbindung, durch Fehlen der H-Brücke zum 5-Phosphatrest des Phytats, weiter verschlechtert. Die Phytasemutante PM11 wies nur den Asn209Leu-Austausch auf. Die Phytaseaktivität war mit ca. 23 U/mg ähnlich hoch, wie die der Mutante PM15. Im Unterschied zu PM15 verringerte sich die Phosphataseaktivität auf 20 U/mg. Somit bewirkte der Asn34-Thr-Austausch die Erhöhung der Phosphataseaktivität. Die beiden Phytasemutanten PM19 und PM20 besaßen ebenfalls Mutationen in den Positionen Asn34 und Asn209. Ziel dieser Mutationen sollte es sein, die Substratspezifität zu verändern. Dazu wurde der Asparaginrest, Asn34, wiederum gegen einen Threoninrest (Thr) und der Asparaginrest, Asn209, gegen einen Glutamatrest (PM19) oder positiv geladenen Lysinrest (PM20) ausgetauscht. Die Phosphataseaktivitäten der beiden Mutanten waren mit 98 U/mg und 82 U/mg ähnlich hoch, aber deutlich geringer als die der PM15 Mutante. Die Phytaseaktivitäten dieser Mutanten waren unterschiedlich. Der Austausch Asn209Glu resultierte in einer Phytaseaktivität von 100 U/mg, die Substitution Asn209Lys hingegen nur in einer Phytaseaktivität von 44 U/mg. Die zusätzlichen

Mutationen, in PM23 und PM24, sollten die Phytaseaktivität stark verringern und die Phosphataseaktivität weiter erhöhen, um so die Substratspezifität weiter zu verändern. Beide Phytasemutanten zeigten eine sehr geringe spezifische Phytaseaktivität. Diese zusätzliche Mutation Lys198Tyr (PM19), führte zu einer Verringerung der Aktivität auf 14 U/mg und zu einer erhöhten Phosphataseaktivität von 85 U /mg. Für die Vierfachmutante PM24 wurde, aufgrund der zusätzlichen Mutation Asp134Ser, eine sehr niedrige Phytaseaktivität von 4,6 U/mg bestimmt. Die Phosphataseaktivität erhöhte sich durch diese zusätzliche Mutation auf 127 U/mg. Die Wirkung des Asp134Ser-Austauschs wurde bereits in der Mutante PM16 untersucht. Diese Mutation bewirkte eine deutliche Reduktion der Phytase- und Phosphataseaktivität auf 59 U/mg und 20 U/mg.

Die Mutationen in PM7 und PM8 waren in der α -Helix I lokalisiert. Es wurde der Leucinrest (Leu245) gegen einen Histidinrest ausgetauscht. Dadurch sollte eine weitere positive Ladung, wie sie bei der *E. coli*-Phytase zu finden ist, in das aktive Zentrum eingebracht werden, um eine zusätzliche Interaktion mit einem Phospharest (wie P4-Position) zu erzielen. Zusätzlich wurden bei der Mutante PM8 die umliegenden Aminosäuren mutiert, um den Histidinrest, ähnlich wie bei der *E. coli*-Phytase zu positionieren. Allerdings sanken die spezifischen Phytase-und Phosphataseaktivitäten dieser beiden Mutanten durch die beschriebenen Aminosäureaustausche stark ab. Es wurden nur 64,5 U/mg bzw. 108,9 U/mg Phytaseaktivität und 6,7 U/mg und 22,1 U/mg Phosphataseaktivität für PM7 und PM8 bestimmt.

Der Austausch des Serinrestes, Ser96, in der Mutante PM9 bewirkte ebenfalls eine merkliche Reduktion der spezifischen Aktivitäten. Dieser starke Einfluss auf die Aktivität der Phytase wurde bereits durch die Random-Mutation RP4 ersichtlich, in der neben dem Serinrest drei weitere Reste mutagenisiert wurden und dabei nur zwei Mutanten mit sehr geringen Aktivitäten identifiziert wurden. Durch den Einbau eines Asparaginrestes fiel die Phytaseaktivität auf 59,1 U/mg und die Phosphataseaktivität von 65 U/mg auf 2,9 U/mg.

In der Struktur der *Klebsiella*-Phytase sind zahlreiche meist positiv geladene Aminosäurereste zu erkennen, die in das aktive Zentrum ragen oder sich in exponierten Positionen oberhalb des aktiven Zentrums befinden. In der PM13 Mutante wurde der Argininrest, Arg262, der sich oberhalb der Aminosäuren des HDTN-Motivs befindet und dabei in das aktive Zentrum ragt, gegen einen Glutamatrest ausgetauscht. Der Einbau einer sauren Aminosäure an Stelle einer basischen resultierte in einem Aktivitätsverlust. Die Phytaseaktivität fiel deutlich auf 133,8 U/mg und die Phosphataseaktivität auf 35,8 U/mg ab.

Die Phytasemutanten PM14 und PM18 zeigten mit 403,9 U/mg und 380,5 U/mg etwa gleiche Phytaseaktivitäten wie die native Phytase (381,2 U/mg). Die Phosphataseaktivitäten von 54,7 U/mg und 59,5 U/mg waren ebenfalls gleich. Die

Substitution des Lysins, Lys195, zu Asparagin beeinflusste offensichtlich die Aktivität der Phytase nicht (PM14). Der Lysinrest hat eine exponierte Position und ragt am Rand des katalytischen Zentrums nach außen. Ein Kontakt mit dem gebundenen Substrat war nicht zu vermuten. Der Austausch des am Rande des aktiven Zentrums positionierten Aspartatrestes, Asp126, hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Aktivität (PM18). Ein Kontakt mit dem Substrat konnte so ebenfalls ausgeschlossen werden.

Neben den Mutanten (PM-Mutanten) mit verringerten Phytaseaktivitäten wurden aber auch drei Mutanten (PM12, PM17, PM22) mit höheren spezifischen Phytaseaktivitäten erzeugt. Die im Standard-Phytasetest ermittelten Aktivitätswerte dieser Mutanten waren mit 418,1 U/mg, 499,4 U/mg und 545,1 U/mg höher als die ermittelte spezifische Aktivität der nativen Phytase (381,1 U/mg). Die Phosphataseaktivitäten blieben mit 65,6 U/mg, 58,5 U/mg und 59,7 U/mg unbeeinflusst. Die PM12 Mutante wies einen Austausch des Lysinrestes, Lys198, gegen einen ebenfalls positiv geladenen Argininrest auf. Der Lysinrest ragt direkt mit seiner Seitenkette in das aktive Zentrum, tritt aber dabei wahrscheinlich nicht in Kontakt mit dem gebundenen Phytat. Bei Substitution des Lysinrestes gegen einen Tyrosinrest (PM21) sank die Phytaseaktivität aber auf 272,5 U/mg und die Phosphataseaktivität stieg leicht auf 82,3 U/mg an.

Ein Austausch des Lysinrestes, Lys135, zu einem Glutamaminsäurerest steigerte die Phytaseaktivität um ca. 110 U/mg (PM17). Dieser Ladungswechsel bzw. die Verkürzung der Seitenkette verursachte diese deutliche Zunahme der Aktivität. Die Kombination der beiden Mutationen aus PM12 und PM17 hatte eine weitere Aktivitätserhöhung von ca. 45 U/mg zur Folge (PM22).

Die Temperatur-und pH-Profile einiger PM-Mutanten

Die beschriebenen Punktmutationen (PM) beeinflussten teilweise deutlich die spezifischen Phytaseaktivitäten. Um die Effekte der Mutationen auf das Temperatur-bzw. pH-Optimum zu überprüfen, wurden die entsprechenden Profile angefertigt.

Die native, getaggte Phytase erreichte die höchste spezifische Phytaseaktivität bei einer Temperatur zwischen 50 und 55 °C (Abbildung 25 I und II). Bei 65 °C war bereits weniger als 10 % der Aktivität messbar. In einem pH-Bereich von pH 3,5 bis pH 6,5 waren die Phytaseaktivitäten zu bestimmen. Das pH-Optimum für den Phytatabbau lag bei pH 5,0 (Abbildung 26 I und II). Die Mehrzahl der Mutanten zeigten ähnliche Temperatur-und pH-Profile. Die aktiveren Mutanten, PM12, PM17, PM22, unterschieden sich kaum in den Temperatur-und pH-Profilen der nativen Phytase. Hier lagen die Unterschiede lediglich in den höheren Phytaseaktivitäten bei niedrigeren Temperaturen. Bei 30 °C konnten so immer noch 50 - 60 % der Phytaseaktivität gemessen werden. Die native Phytase PhyK zeigte hingegen bei 30 °C nur 12 % ihrer maximalen Aktivität (Abbildung 25 I und II).

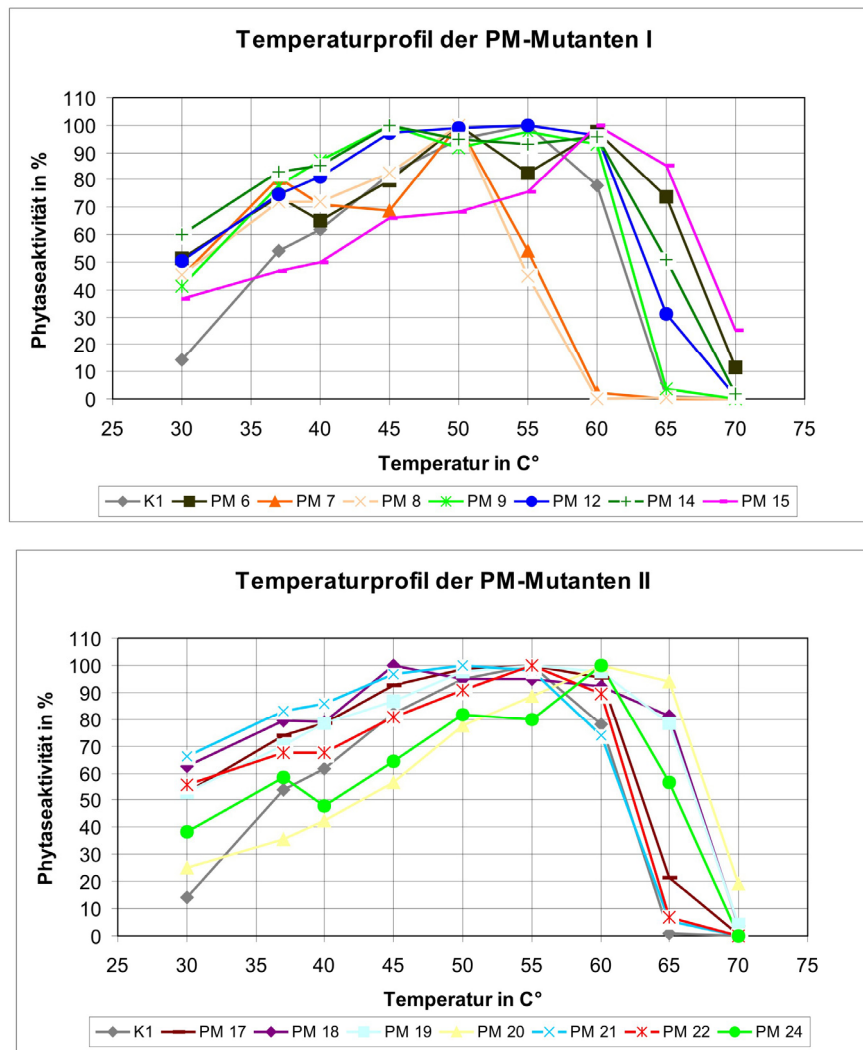


Abbildung 25: Temperaturprofile der PM-Mutanten. Die Phytaseaktivitäten der Punktmutation-Mutanten (PM-Mutanten) wurden bei 30 °C bis 70 °C im Standard-Phytasetest bestimmt. Dargestellt sind die prozentualen Phytaseaktivitäten. Dabei wurde die höchste Aktivität 100 % gesetzt. Die einzelnen Profile sind farbig dargestellt. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten mit 5 mM Na-Phytat und in Dreifachbestimmungen. Die Enzymverdünnungen erfolgten in 0,15 % BSA.

Die Mutanten PM7 und PM8 wiesen ein sehr schmales Temperaturprofil und eine höhere Thermosensitivität auf. Die Temperaturoptima lagen bei 50 °C, jedoch sanken die Aktivitäten um ca. 50 % ab, wenn die Reaktionstemperatur auf 55 °C erhöht wurde (Abbildung 25 I).

Die Phytasemutanten PM15, PM20 und PM24, welche sehr geringe Aktivitäten aufwiesen, zeigten ein Temperaturoptimum von 60 °C. Für die Mutanten PM20 und PM24 waren die pH-Profile sehr schmal. Die Aktivitäten sanken sehr schnell außerhalb der pH-Optima von pH 4,0 ab. Bei einem pH-Wert von 5,0 wurden nur noch 40 % der Aktivität bestimmt (Abbildung 26 I und II). Die Mutante PM6 zeigte ein breites pH-Profil mit einer hohen Aktivität (mind. 50 %) bei pH 6,5.

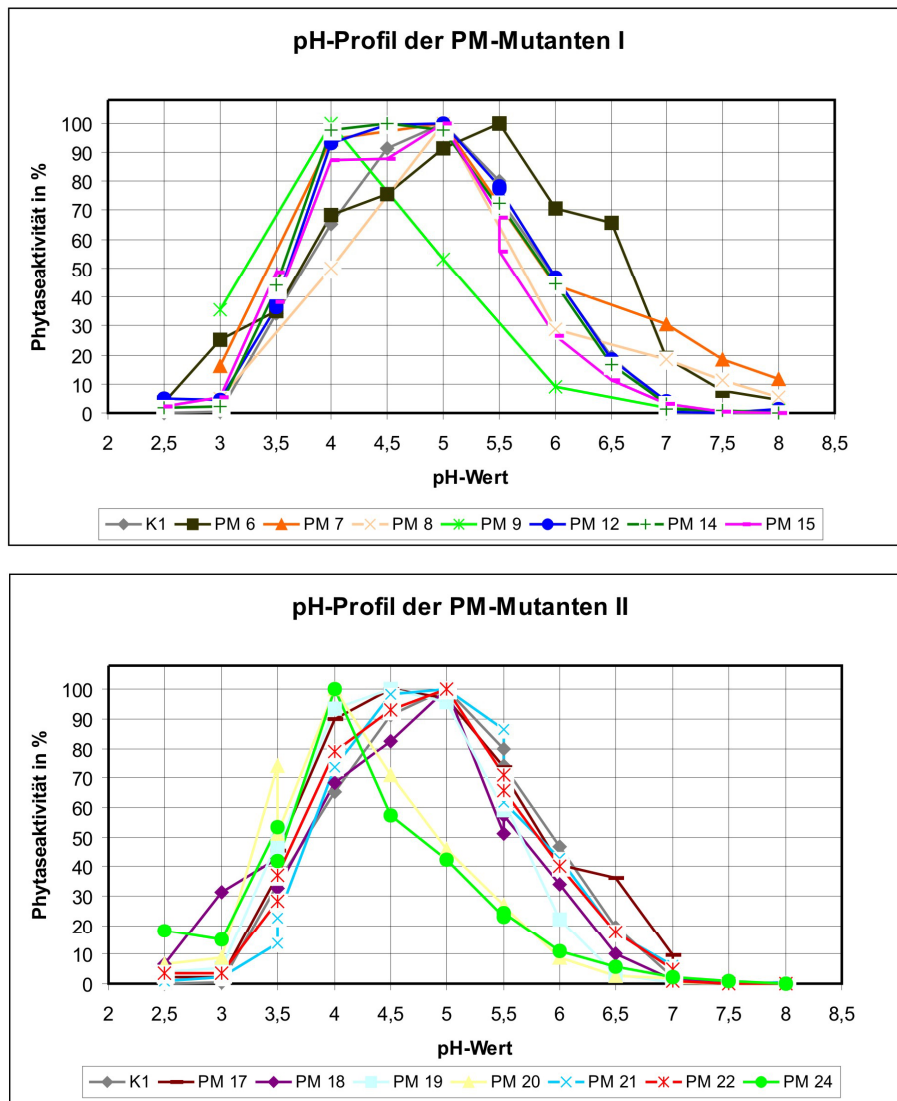


Abbildung 26: Die pH-Profile der PM-Mutanten. In den beiden Abbildungen sind die pH-Profile der PM-Mutanten im Bereich von pH 2,5 bis pH 8,0 farblich dargestellt. Es wurden die Phytaseaktivitäten bei den verschiedenen pH-Werten aufgetragen. Die Aktivität wurde am pH-Optimum 100 % gesetzt und zur Berechnung für die prozentualen Aktivitätswerte verwendet.

Die K_m -und K_{cat} -Werte der PM-Mutanten PM12, PM15, PM17 und PM22

Die Bestimmungen der K_m -Werte erfolgten mit Substratkonzentrationen zwischen 0,1 mM und 0,6 mM. Bei Verwendung von höheren Phytatkonzentrationen wurde, wie schon beschrieben, eine Substrathemmung festgestellt. Dabei waren die Werte der spezifischen Aktivitäten, vor allem die der nativen Phytase PhyK, deutlich von der Substratkonzentration abhängig (Tabelle 5). Die K_m -Werte der Phytasemutanten mit höheren spezifischen Aktivitäten, PM12, PM17 und PM22, wurden mit 0,043 mM, 0,047 mM und 0,045 mM ermittelt und waren im Vergleich zur nativen Phytase unverändert. Die errechneten Wechselzahlen (k_{cat}) von 378 s⁻¹ und 395 s⁻¹ der Enzym-Mutanten PM17 und PM22 waren hingegen geringfügig höher. Für die Enzymmutante PM22 wurde die höchste katalytische Effizienz mit einem Wert von 8816 s⁻¹·mM⁻¹ ermittelt. Die Mutante

PM15 zeigte die vergleichsweise geringste katalytische Effizienz. Der k_{cat}/K_m -Wert von $178 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ war deutlich niedriger als der errechnete Wert der nativen Phytase ($7876 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$). Diese Mutante hatte auch eine geringere Affinität zum Phytat, das der höhere K_m -Wert von $0,158 \text{ mM}$ verdeutlichte. Diese berechneten Werte bestätigten die zuvor im Standard-Enzymtest bestimmte, geringere spezifische Aktivität der PM15-Mutante. Die berechnete spezifische Aktivität von 40 U/mg war aber nur geringfügig höher als die im Standard-Phytasetest bestimmte Aktivität von 26 U/mg . Auch die berechneten spezifischen Aktivitäten der anderen Enzyme, PM12, PM17 und PM22 waren ebenfalls nur unwesentlich höher.

Tabelle 8: Die kinetischen Konstanten der PM-Mutanten.

<i>Klebsiella</i> - Phytase (Mutante)	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat} / K_m ($\text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$)	spezif. Aktivität berechnet (U / mg)	spezif. Aktivität gemessen (U / mg)
PM12 ±	0,043 0,009	338 14	7906 327	483,61 22,58	418,14 1,16
PM17 ±	0,047 0,018	378 19	8099 407	547,71 29,13	499,39 12,33
PM22 ±	0,045 0,014	395 32	8816 724	565,69 41,31	545,09 5,57
PM15 ±	0,158 0,037	28 1	178 7	40,12 1,56	25,79 0,87
K1 ±	0,047 0,019	373 46	7876 972	514,24 57,69	380,74 10,78

2.4. HPIC Analysen der Substratabbauprodukte und Phosphatfreisetzung durch die *Klebsiella*-Phytase und durch die Mutanten (PM)

Die „High Performance Ion Chromatography“ - Analysen (HPIC-Analysen) des Phytatabbaus der nativen *Klebsiella*-Phytase und der PM-Mutanten erfolgten bei 37°C . Anfänglich wurden für die Abbauanalysen Enzymaktivitäten von $0,05 \text{ U/ml}$ eingesetzt. Jedoch zeigten die ersten HPIC-Läufe, dass die Mutanten mit geringeren spezifischen Aktivitäten einen schnelleren Phytatabbau bewirkten. Dies war mit der schon beschriebenen Substrathemmung zu erklären. Aus diesem Grund wurden nachfolgend gleiche Proteinmengen von $0,144 \text{ µg/ml}$ verwendet, um die Generierung der Abbauprodukte und die Phosphatfreisetzung durch die Phytasemutanten und durch die native Phytase zu untersuchen.

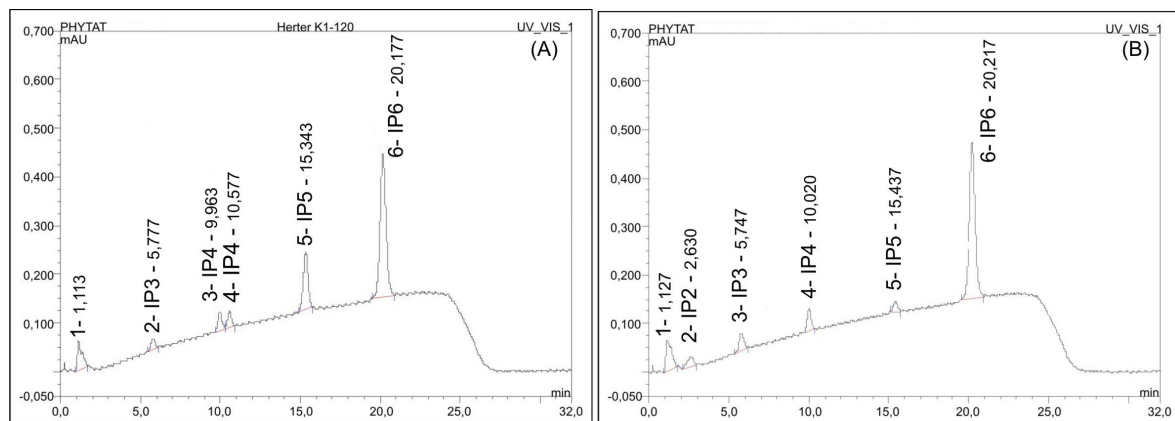


Abbildung 27: HPIC-Analysen der Phytatabbauprodukte der nativen Phytase PhyK und der Mutante PM6 erfolgten wie beschrieben (5.4.8.2.). Dabei wurde das HPIC-Programm (siehe Anhang) verwendet.

(A): HPIC-Lauf des Phytatabbaus der nativen Phytase. Es wurden 4 mM Phytat mit 0,01 U/ml Enzym bei 37 °C inkubiert und nach 120 min mit 10 % TCA abgestoppt. Die Peaks: 1: Lösungsmittel, Phosphat, IP1; 2-IP3: D/L-Ins(2,4,5)P3 / D-Ins(1,2,6)P3; 3-IP4: D-Ins(1,2,5,6)P4; 4-IP4: Ins(2,4,5,6)P4; 5-IP5: D-Ins(1,2,4,5,6)P5 und 6-IP6: Ins(1,2,3,4,5,6)P6 wurden identifiziert.

(B): HPIC-Lauf des Phytatabbaus der Mutante PM6. Es wurden 4 mM Phytat mit 0,05 U/ml Enzym für 120 min inkubiert. Peaks: 1: Lösungsmittel; 2-IP2: D/L-Ins(2,4)P2 / D-Ins(1,2)P2; 3-IP3: D/L-Ins(2,4,5)P3 / D-Ins(1,2,6)P3; 4-IP4: D-Ins(1,2,5,6)P4; 5-IP5: D-Ins(1,2,4,5,6)P5 und 6-IP6: Ins(1,2,3,4,5,6)P6. Während des Phytatabbaus der Mutante PM6 war nur ein D-*myo*-Inositol-tetrakisphosphat (D-Ins(1,2,5,6)P4) zu erkennen.

Die Bestimmung, der durch die native Phytase (PhyK) gebildeten *myo*-Inositolphosphate, war Grundlage, um Veränderungen in den Phytatabbauwegen der Mutanten festzustellen. Die Chromatogramme wurden mit dem Programm Peaknet 6.5 (Dionex) ausgewertet. Anhand der Retentionszeiten von bekannten *myo*-Inositolphosphaten, die durch die *E. coli*-Phytase (Optiphos) und durch die *Aspergillus*-Phytase (Natuphos) generiert wurden, konnten die Phytatabbauprodukte identifiziert und dann die Konzentrationen der Produkte bestimmt werden. In den Analysen wurden ausschließlich die Produkte des Hauptabbauweges der *Klebsiella* Phytase (Greiner & Carlsson, 2006) ermittelt (Abbildung 27 (A)). In der HPIC wurden die Inositolphosphate D/L-Ins(2,4)P2 / D-Ins(1,2)P2, D/L-Ins(2,4,5)P3 / D-Ins(1,2,6)P3, D-Ins(1,2,5,6)P4, D-Ins(1,2,4,5,6)P5 und 6-IP6 (Ins(1,2,3,4,5,6)P6) identifiziert. Die Mutante PM6 zeigte ein verändertes Phytatabbauspektrum, was auf die Substitution des Asparagins zu Threonin (Asn34Thr) zurückzuführen war. Es entstand nur ein *myo*-Inositol-tetrakisphosphat-Isomer, wobei es sich anhand der Retentionszeit um D-*myo*-Ins(1,2,5,6)P4 handelte. Die aktiveren Phytasemutanten PM12, PM17 und PM22 zeigten keine veränderten Phytatabbauspektren. Es wurden alle bekannten Abbauprodukte, einschließlich der *myo*-Inositol-tetrakisphosphate und *myo*-Inositol-diphosphate, ermittelt (Abbildung 28).

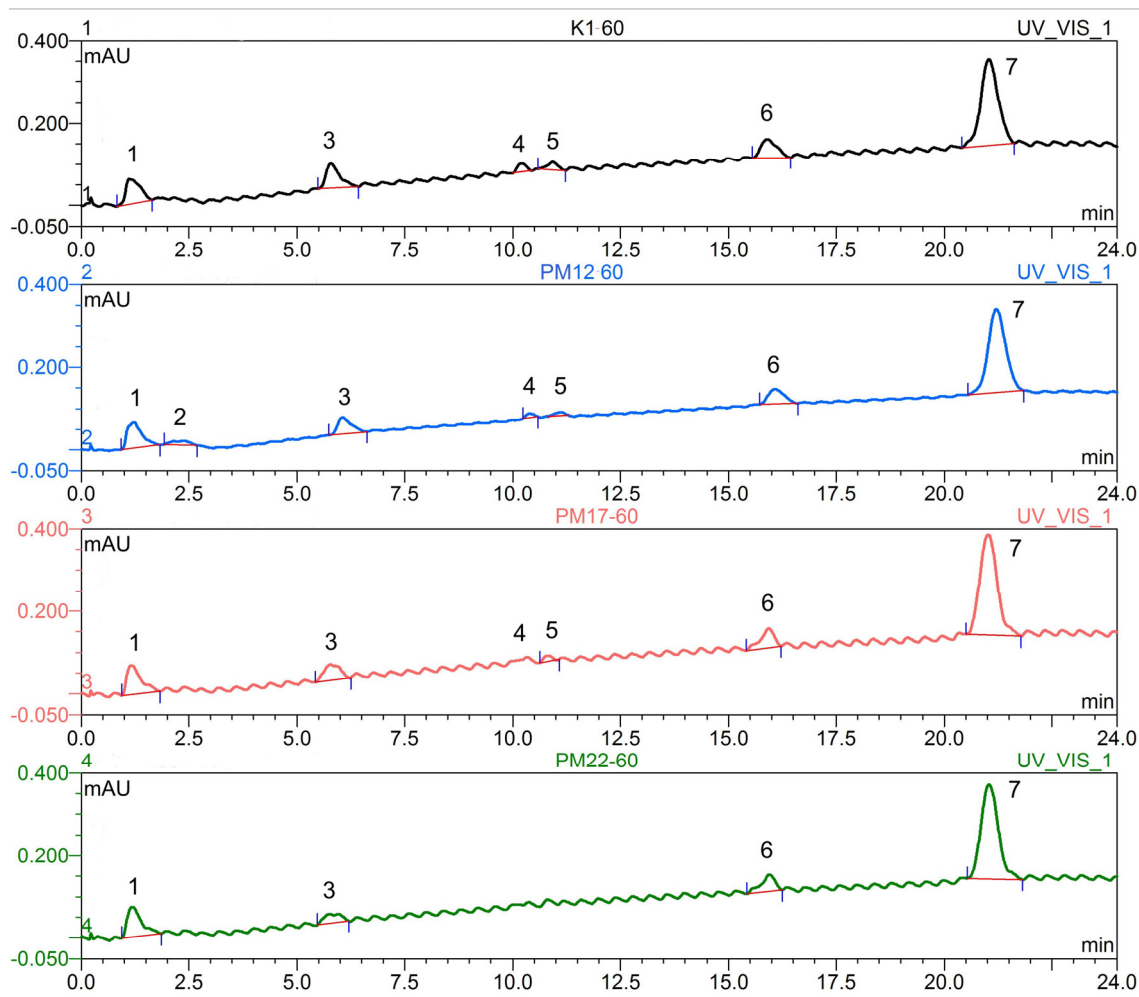


Abbildung 28: Phytatabbau der nativen Phytase PhyK (K1-schwarz) und der Mutanten PM12 (blau), PM17 (rot) und PM22 (grün) nach 60 min Inkubation bei 37 °C und Enzymkonzentrationen von 0,144 µg/ml. Die Proben wurden mit 10 % TCA abgestoppt und 90 µl wurden für die Analysen in der HPLC eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mit Peaknet 6.5 (Dionex) (Natuphos- und Optiphos-Methode). Die Überlagerungen wurden mit Chromeleon (Dionex) angefertigt. Peaks: 1: Phosphat, Lösungsmittel, InsP₁; 2: D/L-Ins(2,4)P₂ / D-Ins(1,2)P₂; 3: D/L-Ins(2,4,5)P₃ / D-Ins(1,2,6)P₃; 4: D-Ins(1,2,5,6)P₄, 5: Ins(2,4,5,6)P₄; 6: D-Ins(1,2,4,5,6)P₅; 7: IP₆ Ins(1,2,3,4,5,6)P₆.

Die Konzentrationsbestimmungen der entstandenen *myo*-Inositolphosphate zeigten aber, dass die verschiedenen Produkte im Vergleich zu der nativen Phytase unterschiedlich stark durch die Mutanten PM12, PM17 und PM22 generiert wurden. (Abbildung 28 und Abbildung 29). Das native Enzym und die Enzymmutanten wiesen einen kontinuierlichen Abbau des Phytats (ca. 3,0 mM) auf. Dieser Abbau verlief jedoch unvollständig. So konnten nach Inkubation von 120 min mit der nativen Phytase immer noch ca. 0,25 mM des Phytats nachgewiesen werden. Nach 30 min wurde bereits das Maximum der InsP₅-Konzentration mit ca. 0,5 mM erreicht (Abbildung 29- K1). Zeitgleich mit dem Abbau des InsP₅ (D-Ins(1,2,4,5,6)P₅) stiegen die InsP₃ (D/L-Ins(2,4,5)P₃ / D-Ins(1,2,6)P₃) Konzentrationen im Ansatz auf ca. 0,8 mM (60 min) deutlich an. Die Konzentrationen der beiden *myo*-Inositoltrikisphosphate (D-Ins(1,2,5,6)P₄; Ins(2,4,5,6)P₄) waren allerdings

sehr gering. Diese InsP4-Produkte wurden wahrscheinlich schnell zu InsP3 umgesetzt. Die generierten InsP3-Produkte der PhyK häuften während des Phytatabbaus an und wurden nur langsam weiter hydrolysiert. Die *myo*-Inositoldiphosphat-Produkte (D/L-Ins(2,4)P2 / D-Ins(1,2)P2) waren, wie bei allen Mutanten, auch nur in sehr geringen Konzentrationen nachzuweisen, das wiederum auf einem schnellen Abbau zu dem Endprodukt, den *myo*-Inositolmonophosphat (D-Ins(2)), zurückzuführen war (Abbildung 29–PM12, PM17, PM22).

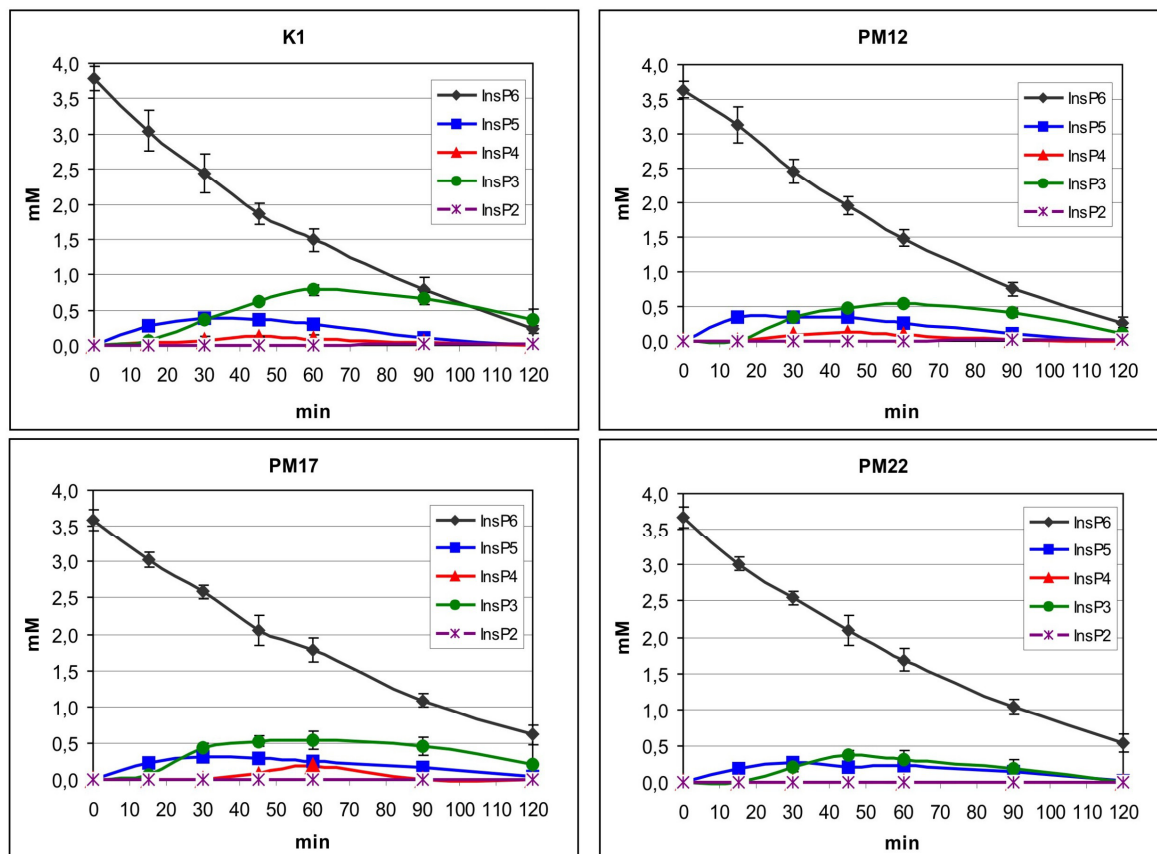


Abbildung 29: Dargestellt sind die Generierungen und der Abbau der *myo*-Inositolphosphate Phytat (schwarz), IP5 (D-Ins(1,2,4,5,6)P5) (blau), IP4 (D-Ins(1,2,5,6)P4 / Ins(2,4,5,6)P4) (rot), IP3 (D/L-Ins(2,4,5)P3 / D-Ins(1,2,6)P3) (grün) und IP2 (D/L-Ins(2,4)P2 / D-Ins(1,2)P2) (violett) durch die native Phytase PhyK (K1), der Mutante PM12 (PM12), der Mutante PM17 (PM17) und der Mutante PM22 (PM22). Der Abbau der Phytat (ca. 3,5 mM) erfolgte mit einer Enzymkonzentration von 0,144 µg/ml (entspricht einer Aktivität von 0,05 U/ml gemessen an der nativen Phytase) bei 37 °C. Der Abbau wurde für 120 min verfolgt, wobei nach 15, 30, 45, 90 und 120 min Proben für die HPLC-Analysen entnommen und mit 10 % TCA abgestoppt wurden. 90 µl der Proben wurden auf die MonoQ-Säule des Dionex-HPLC-Systems aufgetragen und analysiert. Durch die native Phytase wurde während des Phytatabbaus deutlich mehr InsP5, InsP4 und InsP3 generiert. Gleichzeitig wurde nach 120 min mehr Phytat als bei den Mutanten umgesetzt. InsP4 war bei PhyK, PM12 und PM17 nur wenig nachzuweisen. Im Ansatz der Mutante PM22 konnte keine Konzentrationsbestimmung für InsP4 erfolgen. Die Doppelmutante PM22 erzeugte die geringsten Mengen der Phytatabbauprodukte InsP5, InsP4 und InsP3.

In den Reaktionsansätzen der Mutanten PM17 und PM22 wurden nach Ablauf der gesamten Inkubationszeit höhere Phytatkonzentrationen, über 0,25 mM, ermittelt.

Der Phytatabbau durch diese Mutanten war somit nach 120 min anscheinend deutlich geringer. Allerdings waren auch geringere Konzentrationen der InsP5-, InsP4- und InsP3 –Produkte messbar. Es erfolgte vermutlich eine schnelle Hydrolyse des InsP5 (Abbildung 29), was die Phosphatbestimmungen widerspiegeln. Die untersuchten Phytasemutanten schienen also die Zwischenprodukte der Phytatspaltung schneller als das Wildtypenzym zu hydrolysieren.

Im Inkubationsansatz der PM22 Mutante konnte aufgrund der sehr geringen InsP4-Konzentration keine Konzentrationsbestimmung erfolgen. Bei den Substratabbauanalysen der Mutanten PM12 und PM17 waren ebenfalls nur sehr geringe Konzentrationen der InsP4-Isomere bestimmbar. Durch die drei Phytasemutanten erfolgte, im Unterschied zu der nativen Phytase, ein schnellerer Abbau der InsP3-Produkte (D/L-Ins(2,4,5)P3 / D-Ins(1,2,6)P3). Es wurden während der Abbaureaktion ca. 0,75 mM der beiden InsP3-Isomere durch die native Phytase gebildet. Bei den Phytathydrolysen durch die Phytasemutanten wurden nur Konzentrationen von 0,4 mM bis 0,5 mM bestimmt.

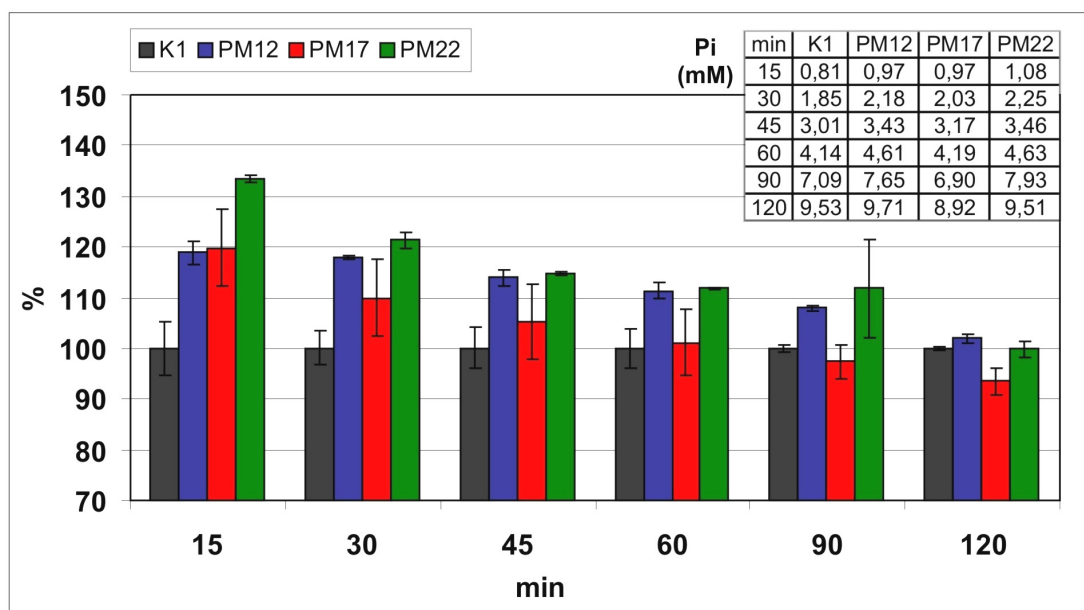


Abbildung 30: Dargestellt sind die Phosphatfreisetzungen durch die native Phytase PhyK (K1-schwarz) und der Mutanten PM12 (blau), PM17 (rot) und PM22 (grün) während des Phytatabbaus (ca. 3,5 mM) bei 37 °C und Enzymkonzentrationen von 0,144 µg/ml. Es sind die veränderten Phosphatfreisetzungen während des Phytatabbaus als %-Werte dargestellt. Die ermittelten Werte der nativen Phytase wurden 100 %gesetzt. Die absoluten Phosphatkonzentrationen in mM sind in der Tabelle der Abbildung dargestellt. Die Phytasemutanten spalteten in den ersten 15 min deutlich mehr Phosphat ab (20 - 33 %). Bei weiterer Inkubation verringerten sich die Unterschiede in der Phosphatfreisetzung (90 min: ca. 10 %). Nach 120 min Inkubation mit Phytat wurden etwa gleiche Phosphatkonzentrationen bestimmt. Die native Phytase PhyK und die Phytasemutanten hydrolysieren ca. 9,5 mM ortho-Phosphat aus 3,0 mM - 3,5 mM Phytat unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen.

Parallel zu den Analysen der generierten Inositolphosphate wurde die Phosphatfreisetzung durch die Phytasen quantitativ bestimmt. Die Phytasemutanten spalteten, nach einer Inkubation von 15 min, deutlich mehr Phosphat ab. Es wurde hierbei

zwischen 20 - 33 % mehr Phosphat freigesetzt (Abbildung 30). Demzufolge war in den ersten 15 min ein schneller Phytatabbau von PM12, PM17 und PM22 zu verzeichnen. Mit fortschreitender Inkubationsdauer verringerten sich diese Unterschiede in den Phosphatfreisetzungen zwischen PhyK und den Mutanten deutlich. Bereits nach 60 min betrug die Differenz der Phosphatkonzentrationen nur noch 10 % und nach einer Inkubation von 120 min wurden etwa Phosphatkonzentrationen in allen Ansätzen bestimmt (Abbildung 30).

2.5. Die Glukose-1-Phosphatase (AgpE) aus *Enterobacter cloacae*

Die Glukose-1-Phosphatase (AgpE) wurde aus *Enterobacter cloacae* VKPM B-2254 (Stammsammlung: State Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganism, Moskau) isoliert (Herter *et al.*, 2006; Shedova *et al.*, 2004). Dies erfolgte in Kooperation mit Frau Oksana Berezina (Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moskau) durch Analyse einer erzeugten Genombibliothek. Dazu wurde die chromosomale DNA des Stammes mit *Sau3A* partiell verdaut und in einen *Bam*HI liniarisierten pUC19 Plasmidvektor ligiert. Nach Transformation der Ligation in *E. coli* XL-1 Blue kalziumkompetente Zellen wurden 10000 Klone mit 5-8 kb Insertionen isoliert. Die Transformanten wurden über einen Screening-Test nach Zinin NV. (Zinin *et al.*, 2004) auf deren Phytaseaktivitäten untersucht. Nach der Sequenzierung des Gens erfolgte die Klonierung in den pET22b(+) Plasmidvektor (pET-1TG1P) mit nativen Signalpeptid und in den pFlag-His-Plasmidvektor (pFlag-His-G1P) hinter die *OmpA*-Signalsequenz. Das pET-1TG1P Plasmid wurde für die Expression in den Expressionsstamm C41 (DE3) und das pFlag-His-G1P Plasmid in den BL21*phoB*::Tn10 Stamm transformiert.

2.5.1. Die Sequenz der AgpE aus *Enterobacter cloacae* und der Vergleich zur Glukose-1-Phosphatase aus *E. coli* Agp

Die Sequenzierung des in pUC-19 ligierten Glukose-1-Phosphatasegens erfolgte mit flankierenden und internen Primern (OB_for1, OB_rev, THG1Pintern1, THG1Pintern2). Das *agpE* Gen besteht aus 1242 bp und wies im Vergleich zum *agp* Gen aus *E. coli* eine Sequenzidentität von 79 % auf. Die aus 413 Aminosäuren bestehende Sequenz der AgpE ist auch zu 79 % mit der Aminosäuresequenz der Glukose-1-Phosphatase aus *E. coli* (Agp) identisch (Abbildung 31). Im Vergleich mit der AS-Sequenz der Phytase aus *E. coli* (AppA) sind hingegen nur 31 % und zur Sequenz der *Klebsiella*-Phytase (PhyK) nur eine Übereinstimmung von 28 % zu verzeichnen.

Das *agpE* Gen besitzt, wie das *agp* Gen (*E. coli*), eine Signalsequenz, welche für ein Signalpeptid kodiert. Das Signalpeptid, das den Transport der AgpE in den periplasmatischen Raum vermittelt, umfasste, laut dem SignalP 3.0 Server (Technical University Denmark), 22 Aminosäuren. Die Prozessierung des Enzyms erfolgt demnach durch die proteolytische Abspaltung der Signalsequenz nach dem VQA-Motiv.

Die prozessierte AgpE besitzt in der AS-Sequenz die typischen konservierten Aminosäuremotive der sauren Histidinphosphatasen (HAPs). Das RHNxRxP-Motiv wird aus dem Histidinrest (His18*) und den zwei Argininresten (Arg17* und Arg21*) gebildet. Die beiden Reste, His289* und Asp290*, bilden das HD-Motiv. Der konservierte Argininrest, Arg94*, ist ebenfalls in der Sequenz vorhanden.

	SP
<i>agpE</i>	1 MRKALLALAVAGSISATFGVQ Q ETPEGYQLEQVLIMS SRHNLRA PLANNGSVLEQSTPKQ
<i>agp E. coli</i>	1 MNKTLIAAAVAGIVLLASNAQ Q TVPEGYQLQ Q VLMS SRHNLRA PLANNGSVLEQSTPNK
<i>agpE</i>	61 WPEWEVPGGQLTTKGGVLEVYMGHYMREWLAQQGMVKTGECPAADSVYAYANSLQ RT VAT
<i>agp E. coli</i>	61 WPEWDVPGGQLTTKGGVLEVYMGHYMREWLA E QGMVKS G ECPP PPYT VYAYANSLQ RT VAT
<i>agpE</i>	121 AQFFITGAFFPGCDVPVHHQEKMGTMPTFNPVITD N SP E FR E KALKAMETERQ K MLTES
<i>agp E. coli</i>	121 AQFFITGAFFPGCDIPVHHQEKMGTMPTFNPVITD S AA F SE Q AVAAME K ELSKLQ L TDS
<i>agpE</i>	181 YKLEQMTNYADSPSCKEKKVCSLADAKDTFSADYEKEPGVSGPLKVGNSLVDAFTLQYY
<i>agp E. coli</i>	181 Y Q LL E KIVNYK D SP A CKEK Q QCSL V DGK N TFS A KY Q QEPGVSGPLKVGNSLVDAFTLQYY
<i>agpE</i>	241 EGFPADQVAWGEIKTDQQWRVLSKLKNGYQDSLFTSTEVAQN V AKPLVKYIDKTLVTEQA
<i>agp E. coli</i>	241 EGFP M DQVAWGEIK S DQ Q W K VLSKLKNGYQDSLFT S PEVA R N V AKPLV S YIDK A LV T D R T
<i>agpE</i>	301 KAPKITLLVGH D SNIASLLTALDFKPYQLHDQ Q ERTPIGGKIVFQRWHDKNANQELMKIE
<i>agp E. coli</i>	301 S A PKIT V LVGH D SNIASLLTALDFKPYQLHDQ N ERTPIGGKIVFQRWHD S KAN R DLMKIE
<i>agpE</i>	361 YVYQSSEQLRNASVLSLQSPAQRVTLELKGCPVDANGFCPVDKFN V MNNAK
<i>agp E. coli</i>	361 YVYQ S A E QLRNADAL T LQ A PAQRVTLEL S GCP I DADGFCP M DKF D SV L NEAVK

Abbildung 31: Proteinalignment AgpE gegen Agp (*E. coli*). Das Alignment wurde durch Verwendung der BLOSUM 62 Substitutionsmatrix und mit Programm Clone Manager 7 erzeugt. Die rot markierten Aminosäuren in der Agp-Sequenz (*E. coli*) sind im Vergleich zur AgpE verändert. Dabei beträgt die Sequenzidentität 79 % zwischen den 413 AS. Die Abspaltung des Signalpeptids (SP) erfolgt nach der 22. Aminosäure. Die konservierten Proteinmotive RHNxRxP und HD sowie der Argininrest R94 sind umrahmt.

2.5.2. Reinigung und Charakterisierung der His-getaggen *Enterobacter* Glukose-1-Phosphatase (AgpE)

2.5.2.1. Reinigung und Größenbestimmung der AgpE

Die Phosphatase AgpE aus *Enterobacter cloacae* wurde mittels Ni-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Reinigung erfolgte aus den Zelllysaten der *E. coli* Expressionsstämme C41 und BL21*phoB* sowohl mit der Ni-NTA als auch mit der nickelbeladenen HiTrap Chelating HP - FPLC-Säule. Nach Dialyse (AgpE D) der

gepoolten Reinigungsfractionen stellte sich die AgpE-Probe als Einzelbande im coomassiegefärbten Gel dar (Abbildung 32).

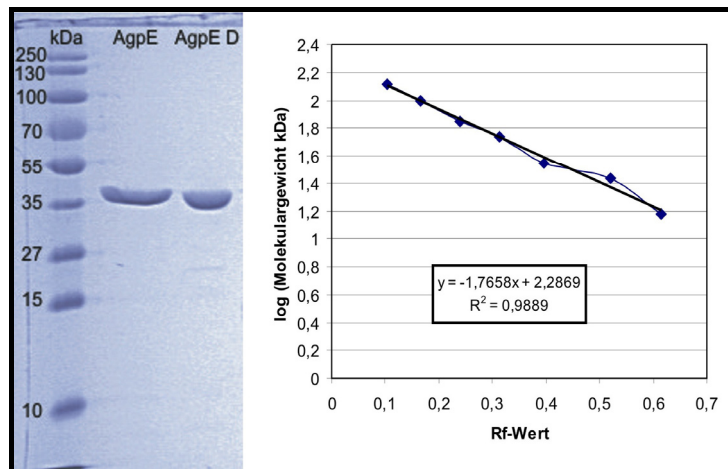


Abbildung 32: SDS-PAGE der AgpE nach His-tag-Reinigung und Eichgerade der Molekulargewichtsbestimmung. Dargestellt ist ein coomassiegefärbtes 12 %iges SDS-Gel (linke Abbildung). Aufgetragen wurden 6 µl des Markers (kDa) (PageRuler (Fermentas)), 12 µl (0,176 µg/µl) des Proteinpools der Fraktionen der His-Tag-Reinigung (FPLC) (AgpE) sowie 12 µl des Proteinpools nach Dialyse (AgpE D). Das Protein wurde vor und nach der Dialyse als Einzelbande im gefärbten Gel sichtbar. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der AgpE Probe und AgpE D Probe wurden die Werte des Logarithmus der Molekulargewichte der Markerproteine gegen die Rf-Werte der Markerproteine aufgetragen (rechte Abbildung). Anhand der dargestellten Eichgeradengleichung wurde ein Molekulargewicht für die AgpE von 44 kDa ermittelt.

Für die getaggte AgpE wurde anhand des in Abbildung 32 dargestellten SDS-Gels ein Rf-Wert von 0,3646 ermittelt. Unter Verwendung der Rf-Werte der Markerproteine wurde die Geradengleichung ($\log (\text{MW}) = -1,7658 \cdot \text{Rf AgpE} (0,3646) + 2,2869$) ermittelt und so ein Molekulargewicht von 44 kDa für die AgpE berechnet (Abbildung 32).

Die Größenbestimmung der His-getagkten AgpE erfolgte zusätzlich auch unter nativen Bedingungen, um eine mögliche Komplexbildung der Phosphatase zu untersuchen. Die Gelfiltrationen wurden in 100 mM Tris/HCl pH 7,5 und Natriumacet pH 5,0 bzw. pH 6,0 mit jeweils 150 mM Natriumchlorid durchgeführt. Die Fraktionen der Gelfiltration wurden auf Enzymaktivitäten und mittels Immunoblotanalyse untersucht.

Die Bestimmung der Molekulargewichte unter nativen Bedingungen zeigte, dass die AgpE Homodimere und vermutlich auch Homotetramere ausbildet. Bei einem pH von 7,5 besaß die AgpE ein MW von 82,5 kDa, was einer dimeren Form entsprach. Bei den pH-Werten von 6,0 und 5,0 wurden hingegen Molekulargewichte von 125,9 kDa und 153,4 kDa bestimmt (Abbildung 33). Dies deutete auf eine Trimerbildung und eventuell auf Tetramerbildung hin. Die Assemblierung von Monomeren schien demnach pH-abhängig zu sein. Bei niedrigen pH-Werten wurde eine Tendenz zur Aggregation der AgpE Monomere deutlich.

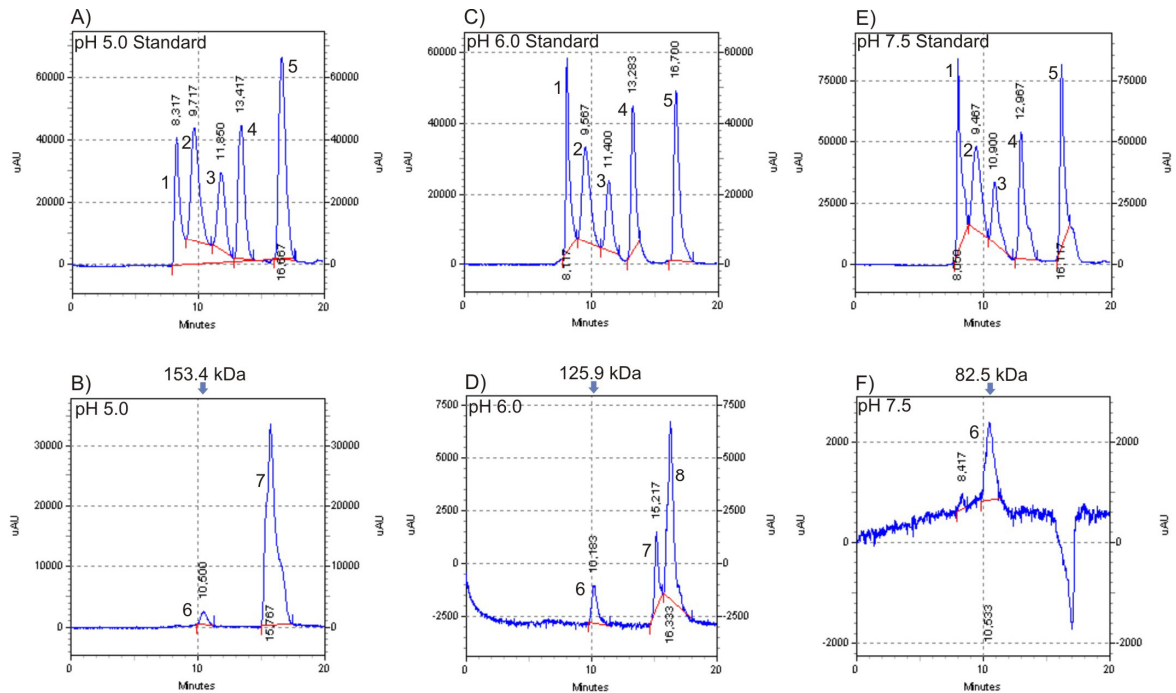


Abbildung 33: Chromatogramme der Größenbestimmung der AgpE. Dargestellt sind die Gelfiltrationsläufe des Standards (Chromatography Standard 6 vials (BioRad)) bei 100 mM Na-Acetat, 150 mM NaCl pH 5,0 (A), pH 6,0 (C) und 100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl pH 7,5 (E). Die Detektion der Peaks erfolgte bei 280 nm. Peak 1: Thyroglobin 670 kDa, 2: Bovine γ -globulin 158 kDa, 3: Chicken ovalbumin 44 kDa, 4: Equine myoglobin 17 kDa, 5: Vitamin B₁₂ 1,35 kDa. Es wurden 4 μ g AgpE auf die Säule (TOSOHAAS TSKgel G2000, 7.8x300mm) aufgetragen. B) AgpE Probe in pH 5,0; 6: AgpE peak, 7: Salz-Peak. D) AgpE Probe in pH 6,0; 6: AgpE-Peak, 7/8: Salz-oder Glycerin-Peak. F) AgpE Probe in pH 7,5; 6: AgpE-Peak.

2.5.2.2. Substratspezifität der AgpE

Die Glukose-1-Phosphatase aus *E. coli* besitzt, wie die meisten sauren Histidinphosphatasen, ein breites Substratspektrum und hydrolysiert neben Glukose-1-Phosphat (G1P), weitere Monosaccharidphosphate, pNPP und auch Phytat (Cottrill *et al.*, 2002).

Zur Bestimmung der AgpE-Aktivitäten gegenüber anderen Substraten wurden die kinetischen Konstanten der Phosphathydrolyse von Glukose-6- (G6P), Fruktose-1-(F1P), Fruktose-6-Phosphat (F6P), Natrium-Phytat und pNPP bestimmt.

Die spezifischen Aktivitäten der AgpE waren für die Monosaccharidphosphate deutlich höher als für die Substrate Phytat und pNPP. Die höchste spezifische Aktivität, von 196 U/mg, zeigte die AgpE gegenüber G1P. Eine etwas geringere Aktivität, von 146 U/mg, wurde für G6P ermittelt, das damit ähnlich effizient wie die verwendeten Fruktose-Phosphate gespalten wurde (Tabelle 9). Für Fruktose-1-Phosphat und Fruktose-6-Phosphat zeigte das Enzym spezifische Aktivitäten von 149 U/mg und 142 U/mg, was in etwa 76 % bis 72 % der ermittelten spezifischen Glukose-1-Phosphataseaktivität entsprach. Für die Substrate Phytat und pNPP waren die spezifischen Aktivitäten

geringer. Die AgpE besaß etwa 32 U/mg (16 %) Phytaseaktivität und 40 U/mg (20 %) Phosphataseaktivität (pNPP).

Tabelle 9: Kinetische Parameter der AgpE für verschiedene Substrate. Ermittelt wurden die Werte aus den Aktivitätsmessungen und K_m -Wertbestimmungen bei 37 °C.

Substrat	K_m (mM)	spezif. Aktivität (U/mg)	spezif. Aktivität (%)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ * mM ⁻¹)
Glukose-1 Phosphat	0,31 ± 0,032	196 ± 23	100	145	464
Glukose-6 Phosphat	0,47 ± 0,053	146 ± 11	74,5	109	230
Fruktose-1 Phosphat	0,62 ± 0,027	149 ± 10	76	111	179
Fruktose-6 Phosphat	0,66 ± 0,090	142 ± 27	72,4	105	160
Phytat	0,51 ± 0,096	32 ± 3	16,3	24	47
pNPP	12,54 ± 1,000	40 ± 1	20,4	30	2

Molekulargewicht 44kDa

Das Enzym hatte eine hohe Affinität zu den Monosaccharidphosphaten, was die niedrigen K_m -Werte (0,31 - 0,66 mM) widerspiegeln. Aber auch für Phytat wurde ein K_m -Wert von 0,51 mM und damit eine ähnlich hohe Enzymaffinität ermittelt (Tabelle 9). Der K_m -Wert für pNPP war mit 12,54 mM deutlich größer als die K_m -Werte der anderen Substrate. Damit besaß die AgpE eine geringere Affinität zu diesem Substrat. Der k_{cat} -Wert (Wechselzahl) und die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) waren für G1P mit 145 s⁻¹ und 464 s⁻¹·mM⁻¹ am größten (Tabelle 9). Damit wurden vergleichsweise mehr Glukose-1-Phosphatmoleküle als Glukose-6-Phosphat- und Fruktose-Phosphatmoleküle pro Zeiteinheit durch das AgpE-Molekül umgesetzt. Die Umsatzraten für die Substrate G6P, F1P und F6P wurden mit k_{cat} -Werten von 109 s⁻¹, 111 s⁻¹ und 105 s⁻¹ bestimmt. Unter Einbeziehung der K_m -Werte konnten für diese Substrate katalytische Effizienzen von 230 s⁻¹·mM⁻¹, 179 s⁻¹·mM⁻¹ und 160 s⁻¹·mM⁻¹ berechnet werden. Für Phytat und pNPP wurden deutlich geringere Wechselzahlen von 24 s⁻¹ bzw. 30 s⁻¹ und auch geringere katalytische Effizienzen von 47 s⁻¹·mM⁻¹ bzw. 2 s⁻¹·mM⁻¹ ermittelt. Damit wurde das Phytat trotz der vermutlich starken Bindung an das Enzym schlechter umgesetzt als die anderen Monosaccharidphosphate.

2.5.2.3. pH- und Temperaturoptima der AgpE

Die AgpE zeigte ein breites pH-Spektrum für die Spaltung von Glukose-1-Phosphat. Die Glukose-1-Phosphataseaktivität war zwischen pH 2,5 und pH 9,0 messbar. Das pH-Optimum lag bei pH 4,5. Bei pH-Wert-Erhöhung fiel die Aktivität nur langsam ab. Bei einem pH von 7 besaß die AgpE eine Restaktivität von ca. 70 % und bei pH 8,0 noch ca. 40 % (Abbildung 34).

Die pH-Optima für die hydrolytische Spaltung des pNPPs und Phytats stellten sich geringfügig verändert dar. Grundsätzlich waren die entsprechenden Aktivitäten in einem schmalen pH-Bereich messbar. Das pH-Optimum der pNPP-Spaltung lag bei einem pH

von 4,0. Die Phosphataseaktivität konnte in dem pH-Bereich von pH 3,0 bis pH 7,0 bestimmt werden, wobei die Aktivität stark ab pH 5,0 sank. Bei einem pH von 6,0 war nur ca. 20 % der Aktivität messbar. Die AgpE zeigte die höchste Phytaseaktivität bei einem pH von 5,0. Die Phytatspaltung erfolgte nur in einem pH-Bereich von pH 3,5 bis pH 6,5. Außerhalb des pH-Optimums fiel die Phytaseaktivität schnell ab. So waren ab einem pH-Wert von 6,0 nur noch geringe Aktivitäten messbar. (Abbildung 34).

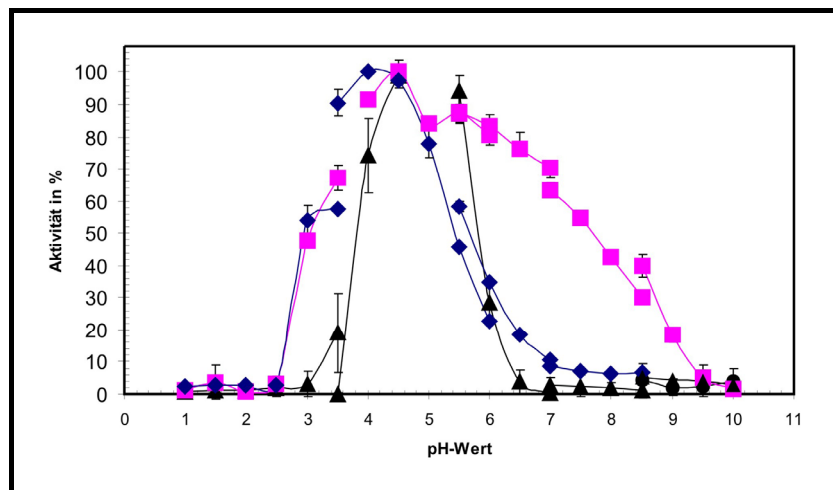


Abbildung 34: In der Abbildung sind die pH-Profile der AgpE für Substrate Glukose-1-Phosphat (G1P), pNPP und Phytat dargestellt. Es wurden die Volumenaktivitäten bei pH-Werten von 1 - 10 bestimmt und als prozentuale Werte mit Standardabweichungen gegen die pH-Werte aufgetragen. Die Bestimmungen erfolgten dabei als Dreifachbestimmungen. Die AgpE besitzt ein pH-Optimum von 4,5 für die Phosphatabspaltung von dem Substrat G1P (magenta-farbene Vierecke). Die pH-Optima für die Phosphatabspaltung vom pNPP (blaue Vierecke) und vom Phytat (schwarze Dreiecke) liegen bei pH 4,0 und pH 5,0.

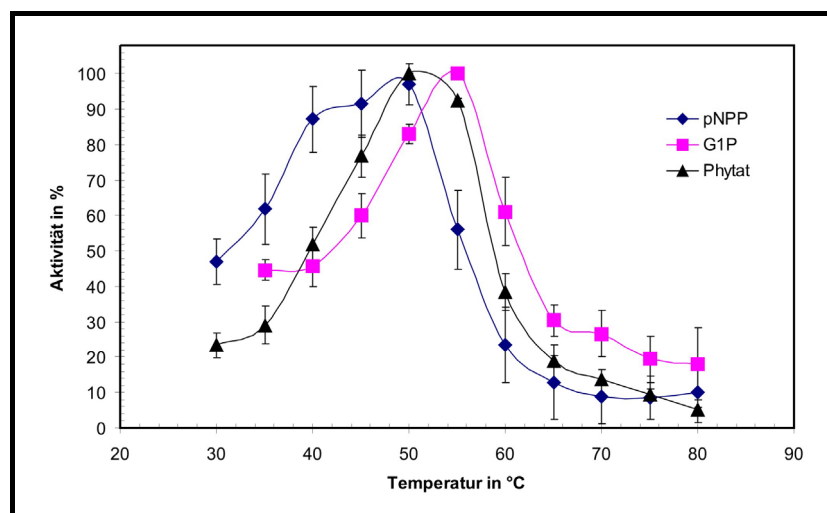


Abbildung 35: Temperaturprofile der AgpE. Gezeigt sind die Temperaturprofile und Optima der AgpE für G1P (magenta-farbene Vierecke), pNPP (blaue Vierecke) und Phytat (schwarze Dreiecke). Die Aktivitäten sind in Prozent gegen die Temperatur der Aktivitätsmessungen aufgetragen. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten als Dreifachmessungen. Die AgpE besaß ein Temperaturoptimum für die G1P-Spaltung bei ca. 55 °C. Die Maxima der Phytat- und pNPP-Hydrolysen wurden bei einer Bestimmungstemperatur von 50 °C erreicht.

Das Temperaturoptimum der Glukose-1-Phosphataseaktivität der AgpE wurde bei 55 °C und die Optima der Phosphatase- und Phytaseaktivität bei 50 °C bestimmt. (Abbildung 35). Bei einer Temperatur von 37 °C waren 45 % der Glukose-1-Phosphataseaktivität, 60 % der Phosphataseaktivität sowie nur 30 % der Phytaseaktivität der AgpE zu verzeichnen. Ab einer Reaktionstemperatur von 65 °C waren insgesamt nur sehr geringe Aktivitäten messbar. So sank die Glukose-1-Phosphataseaktivität im Temperaturbereich von 65 °C bis 80 °C von 30 % auf 20 %. In diesem Temperaturbereich lag die Phosphataseaktivität bei 10 % und die AgpE besaß in etwa 5 - 20 % ihrer Phytaseaktivität.

2.5.2.4. Thermostabilität und pH-Stabilität der AgpE

Die Thermostabilität und auch die pH-Stabilität der AgpE wurden anhand der Phytaseaktivität überprüft. Das Enzym wurde ohne Substrat bei Temperaturen von 23 - 70 °C oder pH-Werten von pH 2,0 bis pH 10,0 vorinkubiert und dann die Restaktivität im Standard-Phytasetest ermittelt.

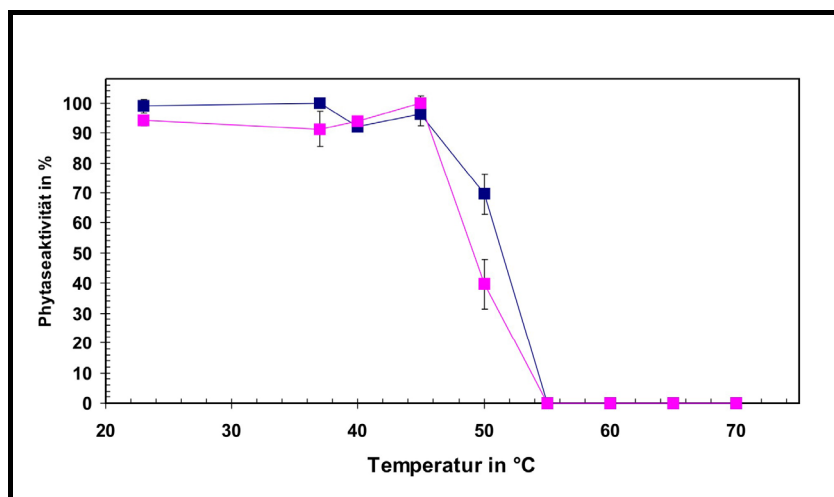


Abbildung 36: Bestimmung der Temperaturstabilität der AgpE durch Ermittlung der Phytaseaktivität. In der Abbildung sind die prozentualen Werte der Phytaseaktivitäten dargestellt, welche nach Inkubation des Enzyms bei 20 - 70 °C für 15 min (blaue Datenpunkte) bzw. 30 min (magentafarbene Datenpunkte) ermittelt wurden. Die Aktivitäten wurden nach Vorinkubation des Enzyms bei 37 °C gemessen. Ab einer Vorinkubationstemperatur von 45 °C sinkt die Enzymaktivität ab. Bei 50 °C kann nur 70 % bzw. 40 % nach einer Vorinkubation von 15 bzw. 30 min gemessen werden. Völlig inaktiviert wird die AgpE ab einer Temperatur von 55 °C.

Die Glukose-1-Phosphatase aus *Enterobacter* besaß eine geringe Thermo- und pH-Stabilität. Das Enzym war nur bis zu einer Temperatur von 45 °C stabil. Nach Vorinkubation des Proteins von 15 min bei 50 °C war nur etwa 70 % Restaktivität (Phytaseaktivität) und nach 30 min Inkubation nur noch 40 % messbar (Abbildung 36). Das Enzym wurde nach einer 15 minütigen Inkubation bei 55 °C vollständig inaktiviert.

Die Enzymstabilität sank bei pH-Werten unter 3,0 stark ab (Daten nicht gezeigt). So war nach 1- und 3-stündiger Inkubation des Enzyms, bei pH 3,0 in Glycin-HCl-Puffer, ca. 74 % der Phytaseaktivität messbar. Nach einer Inkubation für 24 h bei pH 3,0 wurde die AgpE inaktiviert. Die Reduktion der Aktivität war deutlich stärker bei einer Inkubation in einem Glycin-HCl-Puffer mit einem pH von 2,0. Nach 1-stündiger Inkubation waren lediglich 21 % der Phytaseaktivität nachweisbar. Nach 3 h konnten nur 6 % bestimmt und nach 24 h wiederum eine Inaktivierung verzeichnet werden. Bei höheren pH-Werten, zwischen pH 3,5 und 9,0, zeigte die AgpE eine gute pH-Stabilität. Die Phytaseaktivität der AgpE sank nur geringfügig mit zunehmender Inkubationszeit um 15 - 20 %. Die Aktivität der AgpE fiel erst ab einem pH über 9,0 und nach längerer Inkubation (24 h) auf ca. 40 % deutlich ab.

2.5.2.5. Effektoren der AgpE

Die Glukose-1-Phosphataseaktivität und die Phytaseaktivität der AgpE wurden durch zahlreiche Effektoren beeinflusst (Tabelle 10). Zur Untersuchung dieser Einflüsse wurden die einzelnen Effektoren, wie Salze, reduzierende Reagenzien, Detergenzien und Lösungsmittel, den Reaktionsansätzen der Aktivitätsbestimmungen zugesetzt.

Generell wurde die Phytaseaktivität stärker als die Glukose-1-Phosphataseaktivität der AgpE durch Salze beeinflusst. Aus der Gruppe der Salz-Effektoren wirkte besonders Aluminiumchlorid inhibierend auf beide Enzymaktivitäten. Bereits durch den Zusatz von 1 mM Aluminiumchlorid wurde die Phytaseaktivität vollständig inhibiert und die Glukose-1-Phosphataseaktivität auch auf 73 % herabgesetzt. Bei einer Konzentration von 5 mM waren nur noch 14 % der Phosphataseaktivität bestimmbar. Ferner wurde die Glukose-1-Phosphataseaktivität kaum, ausgenommen von Aluminium-Ionen, durch Zugabe von geringen Salzkonzentrationen (1 mM) beeinflusst. Kupfer- und Eisen(III)-Ionen bewirkten einen 10 %igen Aktivitätsverlust. Bei Anwesenheit von höheren Kupfer-, Eisen(II)- und Zink-Ionen-Konzentrationen (5 mM) sanken die Aktivitäten um ca. 20 %, 12,5 % und 12 %. Der Einfluss dieser drei Ionen auf die Phytaseaktivität war deutlich stärker. Die Phytaseaktivität der AgpE fiel bereits bei geringen Ionenkonzentrationen (1 mM) auf 27 %, 69 % und ca. 40 %. Die Wirkung verstärkt sich bei einer Effekorkonzentration auf 5 mM und führte zur Inaktivierung durch Kupferionen und Zinkionen sowie zu einem 67 %igen Aktivitätsverlust durch Eisen(II)-Ionen. Mangan-Ionen wirkten erst ab einer Konzentration von 5 mM stark inhibierend auf die Phytaseaktivität (29,5 %). Andere zweiwertige Kationen, wie Kobalt-, Kalzium-, Magnesium- und Nickel-Ionen beeinflussten die Aktivitäten der AgpE erst ab höheren Konzentrationen, wobei der Effekt auf die Phytaseaktivität stärker war. Die einwertigen Kationen, Natrium-, Kalium-, und Ammoniumionen schienen hingegen keinen Effekt auf die AgpE-Aktivität auszuüben. Weder die Glukose-1-Phosphatase noch die Phytaseaktivitäten veränderten sich durch den Zusatz dieser Ionen.

Tabelle 10: Wirkung von Effektoren auf die Glukose-1-Phosphatase- und Phytaseaktivität der AgpE

	<i>Glukose-1 Phosphat</i>		<i>Phytat</i>	
Effektoren	Aktivität in %		Aktivität in %	
Salze	1 mM	5 mM	1 mM	5 mM
AlCl ₃ · 6H ₂ O	73,9 ± 0,5	14,1 ± 1,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
CaCl ₂	97,0 ± 0,3	99,3 ± 0,1	83,1 ± 0,8	51,0 ± 1,7
CoCl ₂ · 6H ₂ O	100,6 ± 1,0	97,8 ± 3,9	82,4 ± 1,0	49,2 ± 0,9
CuSO ₄ · 5H ₂ O	92,8 ± 0,7	80,7 ± 3,1	27,4 ± 0,8	1,3 ± 33,3
FeCl ₃ · 6H ₂ O	90,8 ± 1,1	87,7 ± 0,9	68,6 ± 1,9	54,5 ± 0,0
FeSO ₄ · 7H ₂ O	108,8 ± 1,1	88,4 ± 0,5	46,0 ± 1,4	22,9 ± 5,8
KCl	97,0 ± 0,0	98,0 ± 0,4	94,7 ± 0,2	101,8 ± 0,2
MgCl ₂ · 6H ₂ O	99,2 ± 1,1	100,9 ± 0,3	89,4 ± 1,0	71,0 ± 2,8
MnCl ₂ · 4H ₂ O	101,0 ± 0,9	98,6 ± 0,8	76,8 ± 0,0	29,5 ± 1,5
NaCl	98,0 ± 0,7	104,5 ± 0,3	92,6 ± 0,7	99,1 ± 2,9
Na ₂ SO ₄	99,3 ± 0,2	95,1 ± 1,4	94,5 ± 0,0	91,4 ± 0,5
NH ₄ Cl	99,4 ± 1,5	95,6 ± 0,4	99,9 ± 1,5	100,9 ± 3,7
NiCl ₂ · 6H ₂ O	99,8 ± 0,1	105,0 ± 0,3	88,9 ± 1,9	70,5 ± 0,3
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	96,9 ± 0,0	88,2 ± 1,2	4,3 ± 40,0	0,0 ± 0,0
reduz. Reagenz.	1 mM	5 mM	1 mM	5 mM
2-Mercaptoethanol	95,6 ± 4,2	89,9 ± 0,7	93,5 ± 3,5	81,5 ± 0,3
DTT	98,6 ± 0,7	60,0 ± 9,3	91,7 ± 2,1	84,2 ± 1,8
TCEP	93,5 ± 3,9	106,7 ± 2,3	86,8 ± 2,5	80,9 ± 3,3
weitere	1 mM	5 mM	1 mM	5 mM
EDTA	101,7 ± 2,0	105,3 ± 0,8	134,0 ± 0,5	123,3 ± 1,2
PMSF	99,4 ± 0,0	93,6 ± 1,5	95,2 ± 5,7	92,7 ± 1,4
Detergenzien	0,1 %	0,5 %	0,1 %	0,5 %
Tween 20	66,5 ± 0,7	7,1 ± 7,7	54,1 ± 14,6	0,0 ± 0,0
Tween 80	71,4 ± 0,9	0,0 ± 0,0	42,4 ± 5,7	0,0 ± 0,0
Triton X-100	73,1 ± 4,0	12,0 ± 2,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
SDS 10%	23,5 ± 0,9	20,5 ± 4,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Lösungsmittel	10 %		10 %	
Aceton	94,5	± 2,4	85,9	± 0,8
1-Butanol	6,4	± 2,2	12,5	± 43,9
Ethanol	78,2	± 0,9	86,2	± 0,5
Isoamylalkohol	56,2	± 6,6	60,2	± 18,2
1-Oktanol	61,9	± 0,9	49,7	± 0,0
2-Propanol	82,1	± 2,6	93,6	± 2,3
Toluol	106,6	± 0,3	97,8	± 1,6

Die reduzierenden Reagenzien, wie PMSF, DTT und β -Mercaptoethanol, setzten die Aktivität der AgpE in höheren Konzentrationen leicht herab. Die Glukose-1-Phosphataseaktivität wurde durch TCEP nicht beeinflusst. Einen starken Einfluss übte hingegen EDTA aus. Die Zugabe von EDTA führte zu einer leichten Erhöhung der Glukose-1-Phosphataseaktivität. Die Phytaseaktivität stieg sogar deutlich um ca. 20 – 30 % an.

Die Detergenzien Tween20, Tween80, TritonX-100 und auch SDS beeinflussten die Aktivität der AgpE sehr stark. Bei Detergenzien-Konzentrationen von 0,5 % war bereits keine AgpE-Aktivität messbar. Die Wirkung der organischen Lösungsmittel 1-Butanol und Isoamylalkohol war schwer zu bestimmen, weil diese Stoffe den Standard-Enzymtest nachhaltig beeinflussten. Vermutlich wurde die Aktivität der AgpE durch Zusatz von 10 % deutlich herabgesetzt. 1-Oktanol setzte die Aktivität ebenfalls um ca. 30-50 % herab.

Toluol und Aceton wirkten hingegen kaum auf die AgpE-Aktivität. Die Lösungsmittel Ethanol und 2-Propanol (Isopropanol) bewirkten ein Abfallen der Glukose-1-Phosphataseaktivität um 20 %. Im etwa gleichen Maße veränderte sich auch die Phytaseaktivität (15 - 20 %).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Aluminium-Ionen, Detergenzien, 1-Butanol und Isoamylalkohol die AgpE-Aktivität stark inhibierten. Die Anwesenheit von Zink-, Kupfer-, Eisen(II)-Ionen, aber auch anderer zweiwertiger Kationen, verringerte die Phytaseaktivität der AgpE deutlich. Nur EDTA übte einen stimulierenden Effekt auf die Phytaseaktivität der AgpE aus.

2.5.2.6. Die Phytatabbauprodukte der AgpE

Für die Glukose-1-Phosphatase war auch Natrium-Phytat ein Substrat. Trotz der guten Substratbindung erfolgte allerdings nur ein geringer Umsatz des Phytats, was durch die geringe Phosphatfreisetzung verdeutlicht wurde.

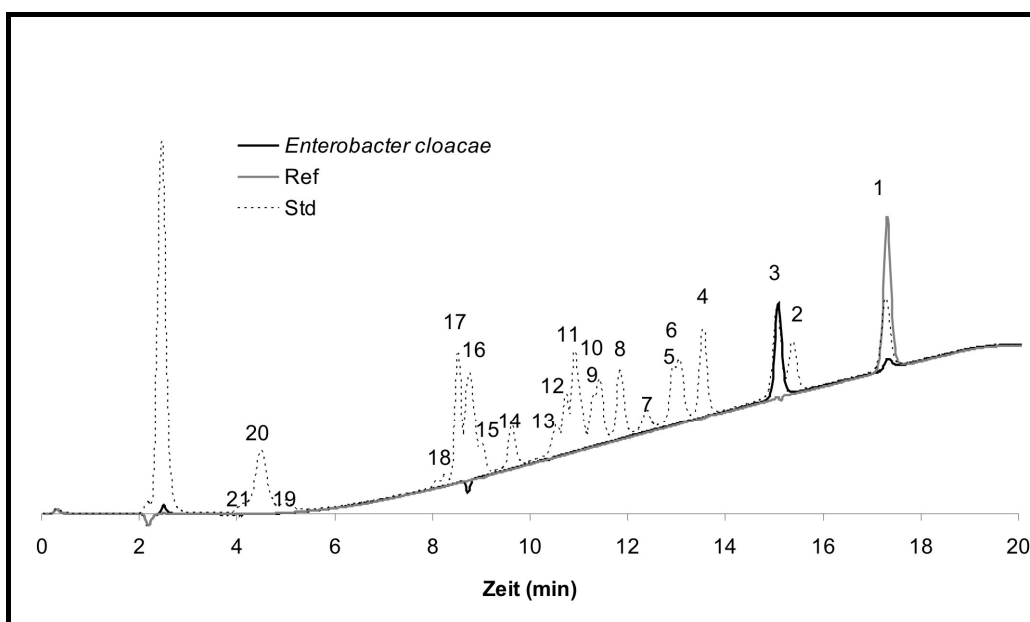


Abbildung 37: Identifikation der Phytat-Abbauprodukte der AgpE (Herter *et al.*, 2006). Die AgpE wurde zusammen mit dem Substrat (Phytat) bei pH 5,0 inkubiert und die Abbauprodukte wurden in der HPIC (high-performance ion chromatography) analysiert. Der HPIC-Lauf des Phytatabbaus ist als eine schwarze, dicke Linie und der Lauf der Referenzprobe (Phytat) als graue Linie dargestellt. Die Peaks der *myo*-Inositolphosphate (Standard) sind durch gepunktete Linien erkennbar: (1) Ins(1,2,3,4,5,6)P₆, (2) Ins(1,3,4,5,6)P₅, (3) D/L-Ins(1,2,4,5,6)P₅, (4) D/L-Ins(1,2,3,4,5)P₅, (5) Ins(1,2,3,4,6)P₅, (6) D/L-Ins(1,4,5,6)P₄, (7) Ins(2,4,5,6)P₄, (8) D/L-Ins(1,2,5,6)P₄, (9) D/L-Ins(1,3,4,5)P₄, (10) D/L-Ins(1,2,4,5)P₄, (11) D/L-Ins(1,2,3,4)P₄, (12) D/L-Ins(1,2,4,6)P₄, (13) Ins(1,2,3,5)P₄, (14) D/L-Ins(1,5,6)P₃, (15) D/L-Ins(1,4,5)P₃, (16) D/L-Ins(1,2,6)P₃, (17) D/L-Ins(1,3,4)P₃, (18) D/L-Ins(1,2,4)P₃, D/L-Ins(2,4,5)P₃, (19) D/L-Ins(2,4)P₂, (20) D/L-Ins(1,2)P₂, Ins (2,5)P₂, D/L-Ins(4,5)P₂, (21) D/L-Ins(1,4)P₂, Ins (1,6)P₂.

Mit der HPIC wurden die Phytatabbauprodukte analysiert. Die Identifizierung erfolgte anhand des Standards, der aus den verschiedenen *myo*-Inositolphosphaten bestand

(Abbildung 37 gestrichelte Linie, Peaks 1-21)). Die AgpE zeigte bei einem pH-Wert von 5,0 einen Abbau des Natrium-Phytats, (Abbildung 37 Peak 1 grau) durch Abspaltung des 3-Phosphatrestes. In den Analysen war nur ein *myo*-Inositolpentakisphosphat-Isomer, das D/L-Ins(1,2,4,5,6)P₅ Produkt, detektierbar (Abbildung 37, Peak 3, schwarz). Im Gegensatz zu den Phytasen, wurde durch die AgpE nur dieser 3-Phosphatrest des Phytats hydrolysiert.

2.5.3. Kristallisation der AgpE mit Phytat

Die AgpE besaß eine große sequenzielle Ähnlichkeit zur Agp aus *E. coli*. Das Enzym zeigte aber eine doppelt so hohe Phytaseaktivität im Vergleich zur Agp (Herter *et al.*, 2006). Durch die Kristallisation mit Phytat sollten die Bindungsstellen zum Substrat und somit die Gründe für die veränderte Phytatseaktivität abgeleitet werden. Im Zuge der Strukturaufklärung der AgpE wurde deshalb eine inaktive His-getaggte Mutante His16Ala (G1P-M1) erzeugt, in der der katalytisch aktive Histidinrest gegen Alanin ausgetauscht wurde. Nach Überprüfung der inaktiven Mutante durch Aktivitätsmessungen wurde das Enzym mittels Affinitätschromatographie (FPLC) gereinigt und das Protein durch Dialyse und entsprechender Konzentrierung (maximal 8 mg/ml) für die Präparation der Kristallisationsansätze vorbereitet (siehe 5.4.2.).

Anfangs wurde nach geeigneten Kristallisationsbedingungen gesucht. Dazu wurde der JB Basic Screen (Jena Bioscience) und der Index Screen (Hampton) verwendet. Für die Kristallisation wurde eine Proteinlösung von 10 mg/ml mit 3 mM Natrium-Phytat eingesetzt. Zur Konzentrationsbestimmung (bei 280 nm) wurde ein Extinktionskoeffizient von 1,16 verwendet. Dieser wurde mittels der Aminosäuresequenz der AgpE und dem ExPASy-Servers sowie dem ProtParam-Tools ermittelt. In 96-Well-Platten wurden zu 1 µl der Proteinlösung 1 µl der Reservoirlösung ohne mischen zugegeben. Nach 1 wöchiger Inkubation der Kristallisationsplatten bei 22 °C war eine Kristallbildung im Index Screen festzustellen. Durch den Zusatz von 0,1 M Bis-Tris pH 6,5 und 20 % Polyethylenglykolmonomethylether 5000 (MME5000) zu der Proteinlösung entstanden kleine, verwachsene, nadelförmige Kristalle.

Die Kristallisationsbedingungen wurden durch das Variieren der Proteinkonzentration, MME5000-Konzentration, Salzkonzentration, Puffer-Art und letztlich durch die Verwendung des „Additive Screens“ (Hampton) optimiert. Die Kristallisationen erfolgten nach der „hanging drop“ Methode. Die inaktive AgpE-Mutante G1P-M1 kristallisiert bei einer Proteinkonzentration von ca. 2,5 mg/ml, 1,5 mM Phytat, 8 % MME5000, 50 mM MES pH 6,0 und mit 10 mM der Additive CaCl₂ x 2 H₂O, Betainhydrochlorid sowie 2 % Benzamidhydrochloride im Ansatz. Es wurden 1,5 µl der Proteinlösung (5 mg/ml) mit 3 mM Phytat und 1,5 µl der Reservoirlösung (500 µl), die aus 0,1 M MES-Puffer pH 6,0, 16

% MME5000 bestand, ohne mischen zusammenpipettiert. Danach wurden je 0,3 µl der 0,1 M konzentrierten Additiv-Lösungen zugesetzt.

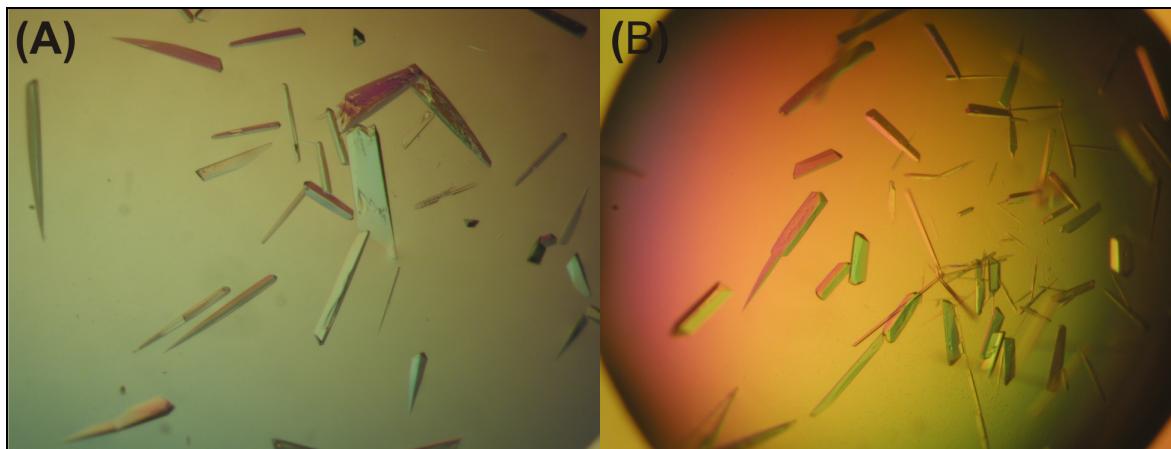


Abbildung 38: Abbildung der Kristallansätze der His-getaggten inaktiven AgpE-Mutante G1P-M1 (H18A). A) mit 10 mM Kalziumchlorid und B) mit 10 mM Betainhydrochlorid. Der Ansatz bestand aus 2,5 mg/ml, 1,5 mM Phytat, 8 % MME5000, 50 mM MES pH 6,0 und den Zusätzen $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ oder Betainhydrochlorid.

Die Verringerung der Phytatkonzentration im Ansatz führte ebenfalls zu einer Kristallbildung und machte so den Einsatz der Zusätze unnötig. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei 22 °C. Bereits nach ca. 2 Tagen konnte eine Kristallbildung beobachtet werden. Die Kristalle stellten sich nadelförmig mit einer Größe von ca. 200 – 400 µm x 200 – 500 µm dar. Diese Kristallbildung erfolgte nur in Anwesenheit von Phytat. Die Aufnahme der Datensätze und die Strukturlösung erfolgte durch molekularen Ersatz unter Verwendung der Struktur der Agp aus *E. coli* durch Dr. Irina Grishkovskaya (AG Proteinstrukturforschung, Charité). Die Messungen erfolgten am Synchrotron BESSY an Beamline 14.1. Es wurden Kristalle mit Zusätzen und Kristalle, die unter verschiedenen Phytatkonzentrationen erzeugt wurden, vermessen. Für alle Kristalle wurde eine Raumgruppe R3 ermittelt. Die Kristalle zeigten eine Streuung bis maximal 1,8 Å. Die Kristallisationsuntereinheit bestand aus zwei AgpE-Molekülen. Es erfolgte ebenfalls eine Kristallisation der inaktiven Muntante unter identischen Bedingungen aber mit Inositolhexasulfat, einem Inhibitor der AgpE (Daten nicht gezeigt). Die Kristalle wurden mit Glycerin eingefroren und am Syncrotron BESSY an Beamline 14.2 vermessen. Sie zeigten eine maximale Auflösung von 1,5 Å und besaßen die Raumgruppe P1. Die Strukturlösung erfolgte ebenfalls durch molekularen Ersatz. Die kristallographische Untereinheit bestand aber diesmal aus vier Molekülen bzw. aus zwei AgpE-Dimeren.

2.5.4. Die Struktur der AgpE und die Substratbindung

2.5.4.1. Die Struktur

Das AgpE-Molekül besaß die typische Struktur saurer Histidinphosphatasen. In der globulären Struktur waren die beiden konservierten Domänen, die α -Domäne und die α/β -Domäne, zu erkennen (Abbildung 39).

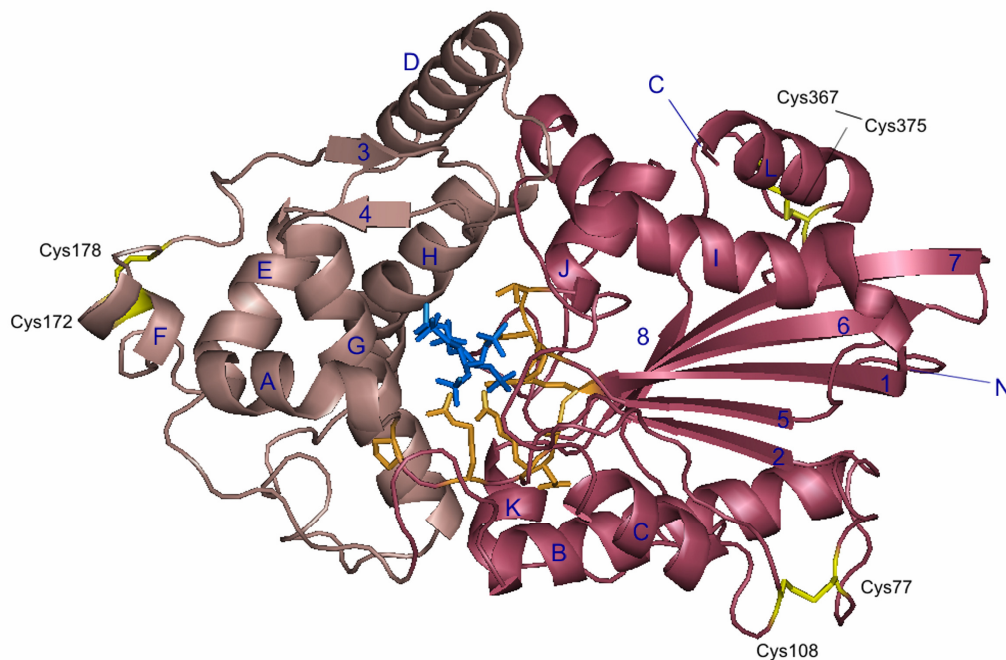


Abbildung 39: Struktur der Glukose-1-Phosphatasemutante His16Ala mit Phytat (blau) im aktiven Zentrum (modelliert). Die α/β Domäne ist dunkel violett und die α -Domäne ist hell violett dargestellt. Die katalytischen aktiven Reste und konservierten Reste des RA(H)NxRxP-Motivs (Arg15, Ala (His)16, Asp17, Arg19, Pro21), des HDN-Motivs (His287, Asp288, Ser289) und der Arg92 sind dunkelgelb und als Sticks dargestellt. Sie sind zwischen den beiden Domänen lokalisiert. Dabei befindet sich das HDS-Motiv am N-Terminus der Helix J. Die drei Disulfidbrücken sind gelb dargestellt und werden aus Cys77/Cys108, Cys172-Cys178 und Cys367/Cys375 gebildet. Phytat liegt mit dem 3-Phosphatrest in der Bindungstasche.

In der α -Domäne waren insgesamt sechs Helices und ein β -Pin-Faltblattmotiv, bestehend aus den zwei Faltblättern 3 und 4, zu finden. Auf jeder Seite des β -Faltblattmotivs, das aus sechs Faltblättern (1, 2, 5, 6, 7, 8) bestand, lagen je drei α -Helices. Das aktive Zentrum war zwischen den beiden Domänen eingebettet und bestand aus den beiden charakteristischen Proteinmotiven der Glukose-1-Phosphatasen, dem RH(A)NxRxP-Motiv und dem HDS-Motiv. Die Helices A, G, H, K und J begrenzten dabei das aktive Zentrum. Die konservierten AS-Reste des RH(A)NxRxP-Motivs befanden sich im Loop-Bereich zwischen dem β -Faltblatt 1 und der α -Helix A. Das HDS-Motiv lag am N-Terminus der Helix J. Drei Disulfidbrücken stabilisierten die Struktur und waren an den Außenbereichen des Moleküls lokalisiert. Der C- und N-Terminus lagen frei in der α/β -Domäne.

2.5.4.2. Elektronendichten der Phytat- und *myo*-Inositolhexasulfat-Bindung

In der Kristallstruktur der inaktiven AgpE mit Phytat konnten nur Elektronendichten von drei Phosphatresten des Phytats identifiziert werden. Die Elektronendichte des *myo*-Inositolrings war nicht sichtbar.

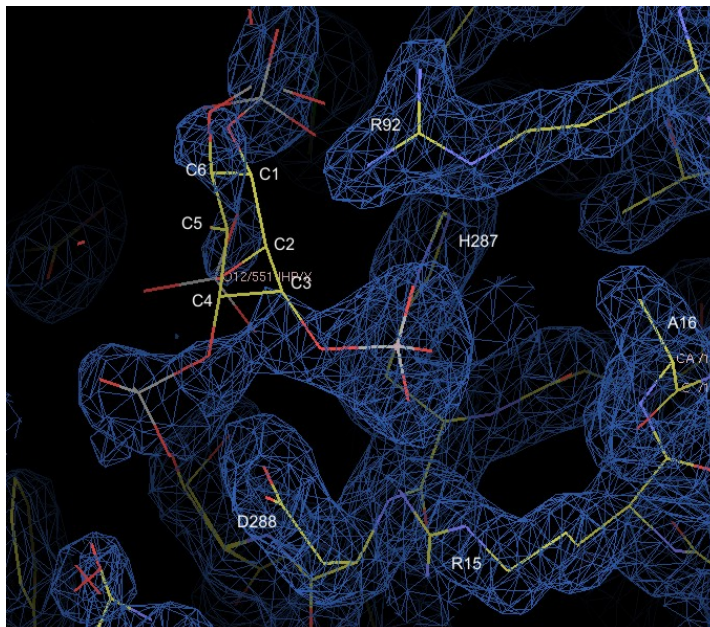


Abbildung 40: Elektronendichten der Phosphatreste am C1-, C3- und C4-Atom des *myo*-Inositolrings des Phytats sowie der koordinierenden katalytischen AS-Reste (Arg15, Arg92, His287, Asp288) und des Alaninrestes Ala16. Die Abbildung wurde mit dem Programm Coot erzeugt.

Auf der Basis der vorhandenen Elektronendichten wurde das vollständige Phytatmolekül in die Struktur modelliert. Nach den Substratabbauanalysen erfolgte die Phytatspaltung ausschließlich durch Hydrolyse des 3-Phosphatrestes. Deshalb wurde das Phytatmolekül mit dem 3-Phosphatrest in der Bindungstasche platziert. Die Elektronendichte für diesen Rest war gut definiert. Entsprechend der molekularen Struktur des Phytats wurden die anderen Reste in die Struktur der inaktiven Glukose-1-Phosphatasemutante eingefügt. Dabei deckten sich der 1-Phosphatrest und der 4-Phosphatrest mit den zwei weiteren Elektronendichten (Abbildung 40). Weitere sekundäre Elektronendichten, vermutlich vom 2-Phosphatrest, waren erkennbar, konnten jedoch nicht eindeutig zugeordnet werden. Die Kristallstruktur mit Inositolhexasulfat lieferte ähnliche Befunde. Es waren durch die höhere Auflösung (1,5 Å) aber Elektronendichten von vier Sulfatresten erkennbar (Abbildung 41). Dabei handelte es sich um den 3-Phosphatrest, der demnach auch in Nähe zum Ala16 lag und um die drei Sulfatreste an den C2-, C4- und C5-Atomen des Substrats. Darüber hinaus waren auch weitere sekundäre Elektronendichten sichtbar, die von dem Inositolring und den anderen Sulfatresten stammen könnten. Die Inositolhexasulfat-Bindung erfolgte durch die AS-Reste im aktiven Zentrum, die auch für die Bindung des Phytats verantwortlich waren.

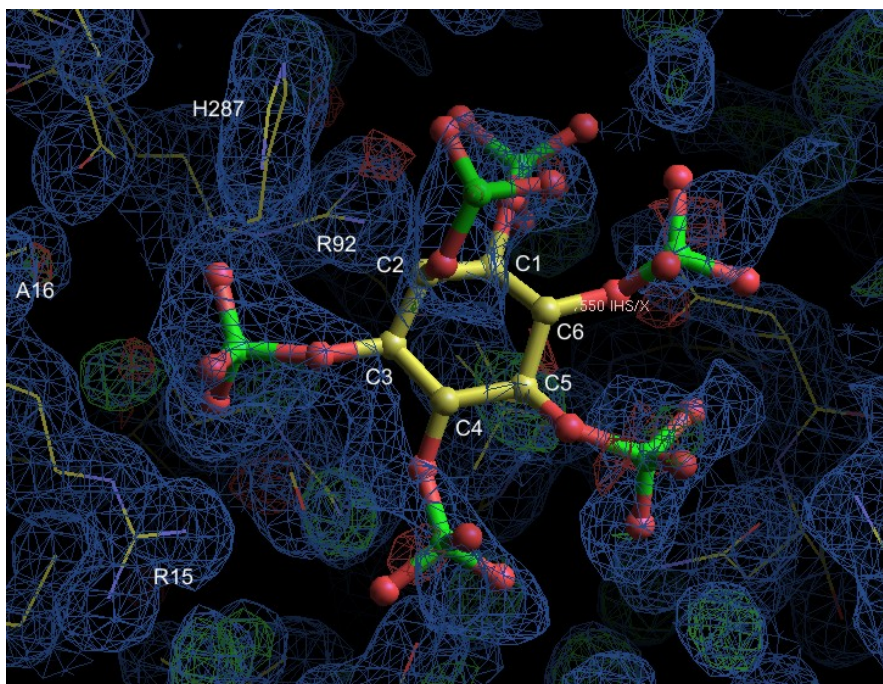


Abbildung 41: Elektronendichten der Sulfatreste an den C1-, C3-, C4- und C5-Atomen des Inositolhexasulfates und der Aminosäuren im aktiven Zentrum der inaktiven AgpE (His16Ala). Die Lage der AS-Reste, His287 (H287), Arg15 (R15) und Arg92 (R92), welche die Bindung über H-Brücken zum 3-Sulfatrest bewerkstelligen, sind gekennzeichnet. Die Abbildung wurde mit dem Programm Coot erzeugt.

2.5.4.3. Die Konformationsänderung und H-Brückenausbildung bei Phytatbindung

Die beiden Phosphatasemoleküle der kristallographischen Untereinheit aus dem Kristall mit Phytat zeigten unterschiedliche Konformationen. Ein Molekül wies eine offene und das andere Molekül eine geschlossene Konformation auf (Abbildung 42). In beiden Molekülen waren die drei Elektronendichten zu erkennen. Die Aminosäurereste Leu22, Ala23, Asn24, Asn25 und Gly26 bildeten in der offenen Konformation einen Loop aus. In der geschlossenen Konformation verlängerten diese Aminosäuren die Helix A, wodurch das aktive Zentrum geschlossen wurde. Die Aminosäuren änderten dabei deutlich ihre Positionen. Das C α -Atom des Leucinrestes verschob sich um ca. 4 Å, der des Alaninrestes um ca. 6,52 Å, die der beiden Asparaginreste um ca. 9 - 10 Å und der des Glycinrestes um ca. 6,7 Å. Dadurch wurde das gebundene Phytatmolekül verschoben und so letztlich für die Spaltung des Phosphatrestes positioniert. Weiterhin rückte der Glutamatrest, Glu194, von ca. 4,8 Å in der offenen Konformation auf 2,9 Å an den Phosphatrest des C2-Atoms und 3,01 Å an den Phosphatrest des C6-Atoms des *myo*-Inositolrings. Es werden also vermutlich zwei zusätzliche H-Brücken zum 2-Phosphat und 6-Phosphat ausgebildet, die zu der notwendigen Fixierung des Phytats beitragen (Abbildung 43 grün).

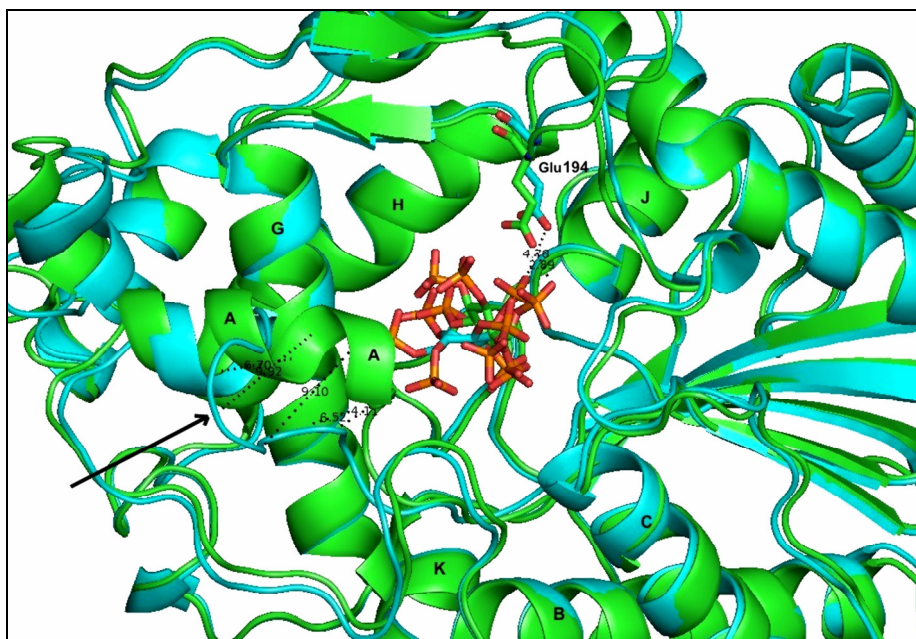


Abbildung 42: Überlagerung der AgpE in der offenen (blau) und geschlossenen (grün) Konformation. Zentral befindet sich Phytat im aktiven Zentrum koordiniert. Die Domänen zeigen eine deutlich veränderte Konformation in der Region der Helix A (Pfeil). In der offenen Konformation (blau) bilden die Aminosäuren Leu22, Ala23, Asn24, Asn25 und Gly26 einen Loop aus, so dass das aktive Zentrum geöffnet ist. Durch Ausbildung der geschlossenen Konformation (grün) rücken diese AS bis zu 10 Å (siehe Bindungslängen) in den zentralen Bereich und verlängern dadurch die Helix A. Dadurch wird das Phytat leicht in das aktive Zentrum geschoben. Gleichzeitig rückt der Rest Glu194 näher an den Phosphatrest am C2-Atom und kann eine Wasserstoffbrücke ausbilden (2,89 Å), wodurch das Phytat zusätzlich fixiert werden kann.

Der katalytisch wichtige Histidinreste His287 wurde durch eine H-Brücke zum Asn88 für die Bindung des 3-Phosphatrestes positioniert. Wahrscheinlich erfolgte dies ebenfalls für den His16 durch Bildung einer H-Brücke zum Asn17, wurde aber durch die His16Ala-Substitution nicht sichtbar.

In der offenen Konformation wurde das Phytat ausschließlich durch die Argininreste Arg15, Arg19, Arg92 und den Asparaginsäurerest, Asp288, sowie durch den Histidinrest, His287, über zahlreiche Wasserstoffbrücken gebunden (Abbildung 43 – blau). Durch die beschriebene Konformationsänderung wurde das Phytat nicht nur durch die zusätzlichen H-Brücken zwischen dem 2- und 6-Phosphatrest und Glu194, sondern auch durch Ausbildung der H-Brücke zwischen 5-Phosphatrest und Tyr245 stabilisiert (Abbildung 43 – grün). Dadurch werden in dieser Konformation alle Phosphatreste des Phytats gebunden. Während der Verschiebungen veränderte der Phosphatrest am C3-Atom die Position kaum. Der 3-Phosphatrest wurde auch in dieser geschlossenen Konformation über H-Brücken zu den Argininresten, Arg15, Arg19, Arg92, dem Asparaginsäurerest, Asp288, und dem Histidinrest, His287, fixiert, wobei sich die Bindungsabstände leicht veränderten. In beiden Konformationen war zwischen dem 3-Phosphatrest und dem Alaninrest, Ala16, eine Elektronendichte von Wasser zu erkennen. Das Phytat mit dem 3-Phosphatrest würde wahrscheinlich eine leicht veränderte Position in der nativen Form der AgpE

einnehmen. Dabei könnte der Rest weiter oder näher in Richtung des Histidinrestes (His16) rücken, was eventuell die Veränderung einiger Bindungslängen der H-Brücken zur Folge hätte.

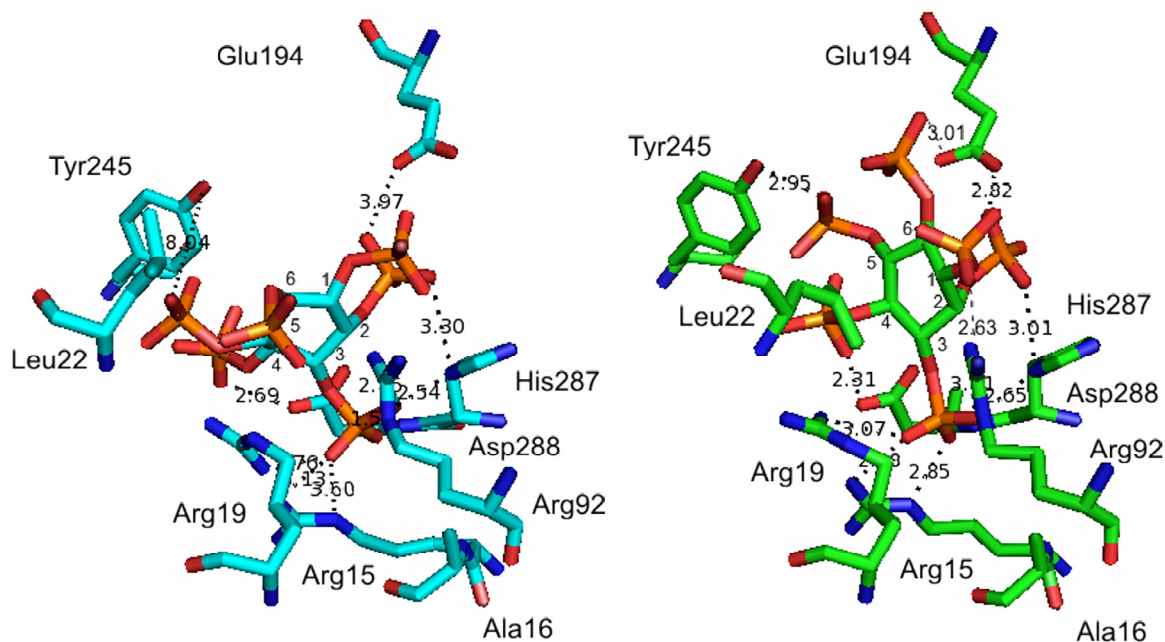


Abbildung 43: Vergleich der Position des Phytats in der offenen (blau) und geschlossenen (grün) Konformation der inaktiven AgpE-Mutante. In beiden Konformationen wird das Phytat, insbesondere der Phosphatrest am C3-Atom, durch H-Brücken zu den Argininresten Arg15, Arg19, Arg92 sowie durch die Reste Asp288 und His287 fixiert. In der geschlossenen Konformation wird das Phytat deutlich verschoben. Dabei rückt der Leucinrest, Leu22, durch die schon beschriebene Verlängerung der Helix A, näher an das Phytat heran und schiebt das Phytat so, dass der Glutamatrest Glu194 eine zusätzliche H-Brücke zum Phosphatrest am C2-Atom des *myo*-Inositolrings ausbilden kann. Weiterhin bewirkt diese Verschiebung eine bessere Fixierung des 5-Phosphatrestes über eine H-Brücke zum Tyr245 und eine mögliche Fixierung des 4-Phosphatrestes durch eine H-Brücke zum Asparaginsäurerest Asp288.

Im Gegensatz zu den Dimeren, bei denen eine Phytat induzierte Konformationsänderung ersichtlich wurde, zeigten die vier Moleküle der kristallographischen Untereinheit des Kristalls mit *myo*-Inositolhexasulfat alle eine geschlossene Konformation. Das Substrat wurde aber auch hier über die gleichen H-Brücken zu den beschriebenen Resten fixiert. Der Grund dafür könnte die inhibitorische Wirkung des *myo*-Inositolhexasulfates sein. Nach der Bindung scheint das Enzym nicht mehr in die offene Konformation übergehen zu können und wird dadurch blockiert.

2.5.5. Überprüfung der Substratbindung der inaktiven Glukose-1-Phosphatase aus *Enterobacter* durch ITC-Messungen

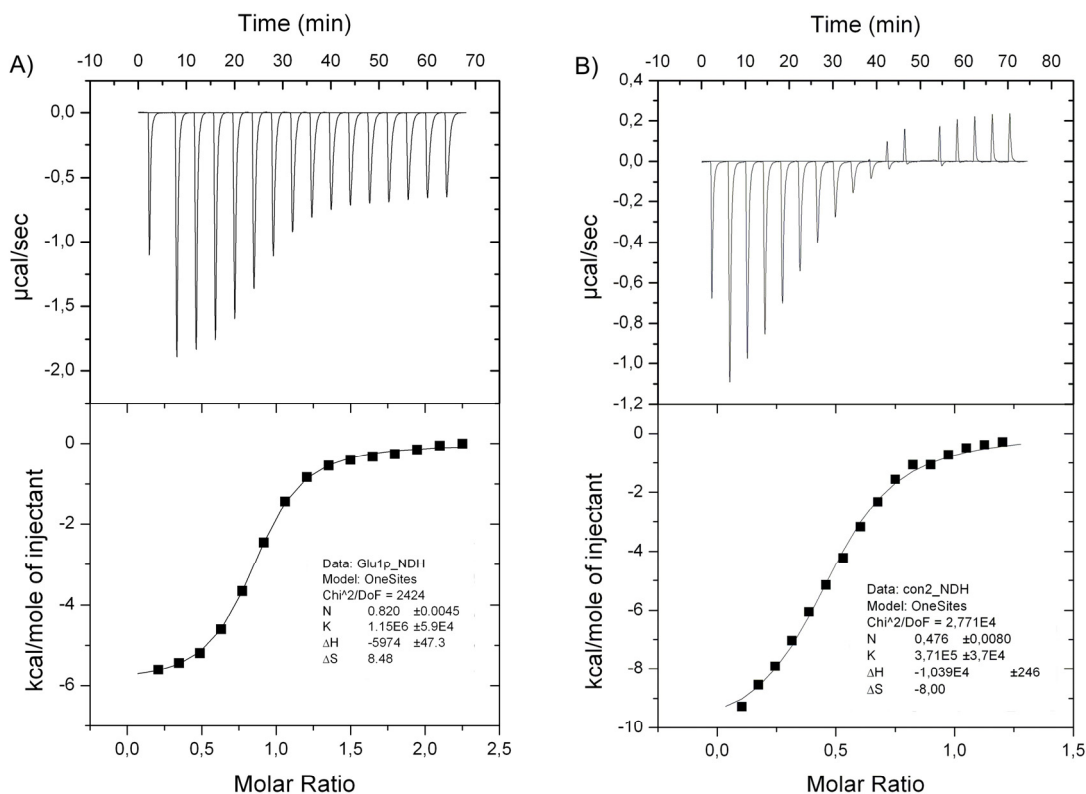


Abbildung 44: Die Darstellung der Thermogramme sowie die Auswertung erfolgten mit Origin 7.0. Die ITC-Messungen erfolgten bei 37 °C in 100 mM Na-Acetat-Puffer pH 5,0 für die Substrate Glukose-1-Phosphat (A) und Phytat (B). Es wurden 1,4 ml der inaktiven AgpE (His16Ala) mit einer Konzentration von 25 µM (Glukose-1-Phosphat) bzw. 50 µM (Phytat) vorgelegt. Schrittweise (30 Injektionen) wurden 5 - 10 µl unter Rühren zugegeben und die Energieänderung bestimmt.

Die Auswertungen der Messdaten der Röntgenstrukturanalysen der inaktiven Phosphatasemutante His16Ala zeigten stets eine gut definierte Elektronendichte im aktiven Zentrum, die mit großer Wahrscheinlichkeit von einem Phosphatrest des Phytats stammte. Es konnten, neben zwei weiteren Elektronendichten (Phosphat) keine Elektronendichte des *myo*-Inositolrings identifiziert werden. Die Isotherme Titrations-Calorimetrie (ITC)-Messungen wurden durchgeführt, um die Bindung von G1P, Phytat und Phosphat an das inaktive Enzym zu überprüfen und die Affinitäten zu den genannten Substraten zu ermitteln (5.4.9.5).

Nach Auswertung der ITC-Messungen durch Intergration der Peaks aus dem Thermogramm waren die typischen sigmoiden Titrationskurven erkennbar. In der Tabelle 11 sind die Messwerte und die berechneten freien Energien der Substratbindung dargestellt. Beide Substratbindungen sind exotherm, was die berechneten freien Energien ΔG widerspiegeln. In der Titration mit Phytat überlagerte die exotherme Bindung eine

endotherme Reaktion, die erst bei Substratsättigung detektierbar wurde. Vermutlich handelte es sich hierbei um eine Verdünnungsenthalpie, die durch die Phytatverdünnung zustande kommt. Für die Bindung von G1P an die Glukose-1-Phosphatase wurde eine Bindungskonstante K_B von $1,15 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ und für Phytat von $3,71 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ermittelt. Die K_B -Werte und die daraus resultierenden Dissoziationskonstanten K_D von $0,87 \text{ }\mu\text{M}$ und $2,7 \text{ }\mu\text{M}$ stehen für eine gute Substratbindung. Die Affinität der Enzymmutante zum G1P ist damit nur geringfügig höher als zum Phytat. Die Substitution des katalytisch aktiven Histidinrestes zu Alanin behindert folglich nicht die Bindung der Substrate Glukose-1-Phosphat und Phytat im aktiven Zentrum. Die Werte des Parameters N, ein Maß für die Anzahl der besetzten aktiven Zentren, waren bei den Messungen für Glukose-1-Phosphat und Phytat unterschiedlich. Danach waren etwa alle aktiven Zentren durch G1P ($N=0,82$), aber nur die Hälfte ($N=0,48$) durch Phytat besetzt. In den ITC-Messungen wurden keine Enthalpieänderungen bei den Titrations von Phosphat und Natriumacetat ermittelt. Damit besaß das Enzym keine Affinitäten zu diesen Substraten (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 11: Daten der ITC-Messungen. Die Berechnungen der Dissoziationskonstante (K_D) erfolgte nach $K_D=1/K_B$ und die der freien Energie ΔG nach $\Delta G=-R \cdot T \cdot \ln K_B$, wobei R (die molare Gaskonstante) $1,98 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ und T (die Temperatur) 310 K ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) eingesetzt wurden. Die anderen Parameter N (Maß für die besetzten Zentren), K_B (die Bindungskonstante), ΔH (die Bindungsenthalpie) und ΔS (die Entropie) wurden unter Verwendung von Origin 7.0 berechnet.

Titration	N	$K_B (\text{M}^{-1})$	$K_D (\text{M})$	$\Delta H (\text{cal} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S (\text{cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta G (\text{cal} \cdot \text{mol}^{-1})$
G1P	0,820	$1,15 \cdot 10^6$	$8,7 \cdot 10^{-7}$	-5974	8,48	-8566
Phytat	0,476	$3,71 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^{-6}$	-10390	-8,00	-7871

2.5.6. Mutationsanalysen der Phosphatase

Die AgpE gehört zur Gruppe der phytatspaltenden sauren Histidinphosphatasen. Die Glukose-1-Phosphatase hydrolysierte einen Phosphatrest des Phytats, wie das strukturell und funktionell sehr ähnliche Enzym aus *E. coli* (Agp), in der 3-Position zu einem D/L-Ins(1,2,4,5,6)P₅ (Abbildung 37).

Die großen strukturellen Ähnlichkeiten der AgpE zur Phytase aus *E. coli* und *Klebsiella*, bei stark unterschiedlichem Substratabbau für Phytat, waren Anstoß für die Mutagenese der AgpE. Ziel war es, durch gezielte Mutationen einen weiteren Abbau des D/L-Ins(1,2,4,5,6)P₅ zu bewirken.

Substitutionen im AgpE- Molekül

Die Mutationspunkte wurden mit Hilfe der Strukturen der *Klebsiella* Phytase, *E. coli* Phytase und der Struktur der Glukose-1-Phosphatase aus *E. coli* (Agp) ausgewählt. Dabei wurden strukturelle Besonderheiten der Agp mit einbezogen. Der Leucinrest, Leu22,

wurde zusammen mit dem Glutamatrest, Glu194, als die Schlüsselaminosäuren beschrieben, die sterisch die Phytatbindung beeinflussen bzw. behindern (Lee *et al.*, 2003). Diese Aminosäurereste waren auch in der AS-Sequenz der AgpE vorhanden und wurden demzufolge mutagenisiert (Abbildung 45, PMG-I / II / IV / IX). Des Weiteren wurde der Serinrest, Ser289, des HDS-Motivs gegen einen Threoninrest ausgetauscht, um so das HDT-Motiv der Phytasen herzustellen (Abbildung 45, PMG-VII / IX). Weitere Mutationen von AS-Resten, die in das aktive Zentrum ragen, sollten Aufschluss über mögliche Wechselwirkung der AS mit den Phosphatresten des Phytats aufzeigen (Abbildung 45, PMG-V / VI / X / XII / XIII).

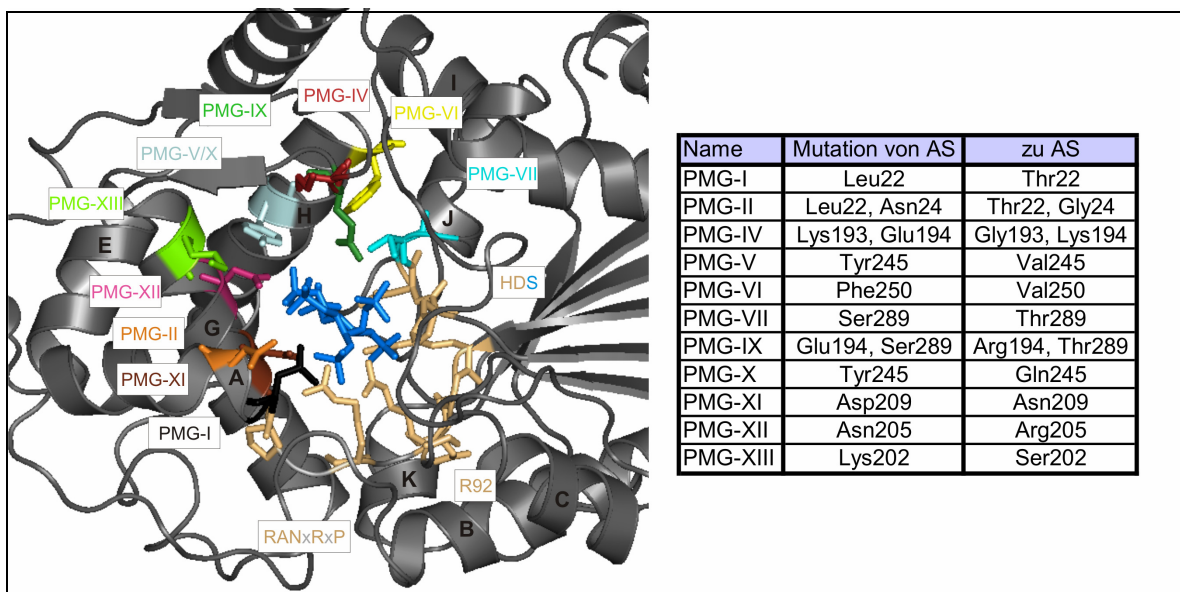


Abbildung 45: Mutationspunkte im AgpE-Molekül. Links sind die mutierten Aminosäurereste farbig gekennzeichnet. Eine Übersicht über die Mutationen liefert die Tabelle (rechts). Die Mutationsstellen waren vorrangig an den Randzonen des aktiven Zentrums zu finden. Die katalytisch aktiven und funktionell wichtigen Aminosäurereste (beige) des RH(A)NxRxP-Motivs und HDS-Motivs sowie des Argininrestes Arg92 blieben dabei unverändert.

2.5.6.1. Die spezifischen Aktivitäten der Glukose-1-Phosphatasemutanten (AgpE-Mutanten)

Die Aktivitäten der Glukose-1-Phosphatasemutanten wurden im Standardenzymtest bestimmt. Die native Phosphatase besaß spezifische Aktivitäten von ca. 197,5 U/mg für G1P und 31,6 U/mg für Phytat. Damit betrug die Phytaseaktivität ca. 16 % der Glukose-1-Phosphataseaktivität. Grundsätzlich wurden die Phytaseaktivitäten durch die Mutationen stärker beeinflusst als die Phosphataseaktivitäten, was die stark verringerten Phytaseaktivitäten widerspiegeln.

Die Mehrzahl der Mutagenesen führten, bis auf die Mutationen in den PMG-VII -und PMG-X-Mutanten, zu einem Abfall der Glukose-1-Phosphataseaktivitäten. Es war ein Abfall der Glukose-1-Phosphataseaktivität auf ca. 42,5 U/mg bis 100 U/mg bei den

Mutationen der PMG-I-, PMG-II-, PMG-V-, PMG-VI-, PMG-XII- und PMG-XIII-Mutante zu verzeichnen. Gleichzeitig sanken auch die Phytaseaktivitäten stark. Die ermittelten Werte der Phytaseaktivitäten lagen zwischen 2,8 U/mg und 8,8 U/mg.

Die Mutanten PMG-IV, PMG-IX und PMG-XI zeigten um ca. 50 - 80 U/mg verringerte Phosphataseaktivitäten. Bei den Mutanten PMG-IX und PMG-XI sanken die Phytaseaktivitäten auf ca. 6,2 U/mg und 1,2 U/mg deutlich ab. Nur die Phytaseaktivität der PMG-IV-Mutante war mit 21 U/mg (14 %) relativ hoch.

Die beiden Mutanten PMG-VII und PMG-X zeigten leichte und im Fall von PMG-X stark erhöhte Glukose-1-Phosphataseaktivitäten.

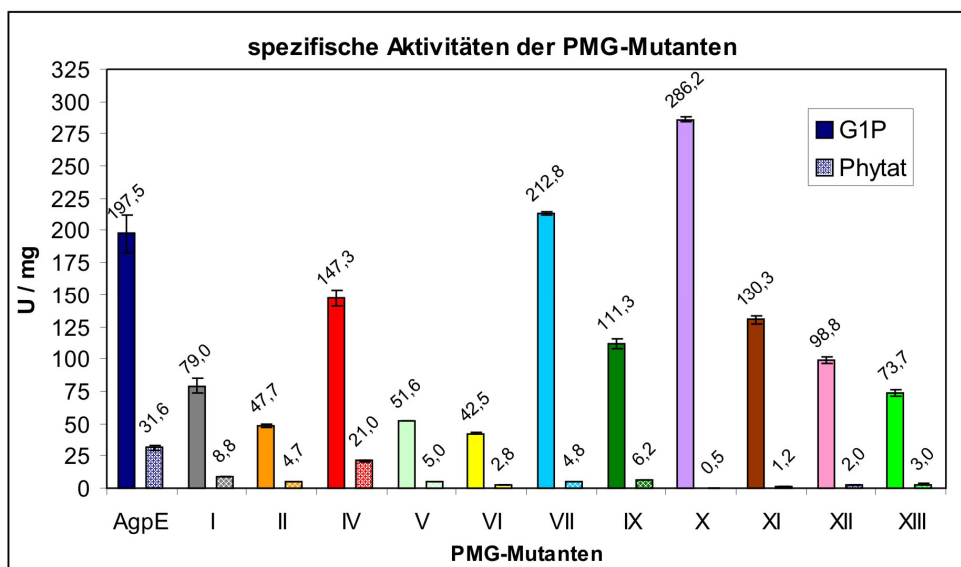


Abbildung 46: Spezifische Aktivitäten der PMG-Mutanten. Die spezifischen Glukose-1 Phosphat- und Phytaseaktivitäten wurden als Dreifachbestimmungen im Standardenzymtest ermittelt. Die Proteinkonzentrationsbestimmungen erfolgten nach Bradford. Es wurden 5 mM der Substrate im Test eingesetzt. Die Werte der Aktivitäten sind als Balken (farbig) mit Standardabweichungen für die native Glukose-1-Phosphatase aus *Enterobacter* (AgpE) und für die Punktmutanten (PMG) dargestellt.

2.5.6.2. HPIC-Analysen der AgpE und der PMG-Mutanten

Es wurden die Phytatabbauprodukte der AgpE und der AgpE-Mutanten mittels HPIC analysiert. Dazu wurden gleiche Enzymmengen (26 µg) mit dem Phytat für 5 h inkubiert und dann mit 10 % TCA abgestoppt. Zusätzlich wurden Phosphatbestimmungen der Proben durchgeführt.

Die AgpE spaltete einen Phosphatrest vom Phytat ab (Abbildung 47 ,G1P (blau)). Es entstand ein D-Ins(1,2,4,5,6)P5. In den Analysen wurden zwei Mutanten, PMG-IV und PMG-IX, identifiziert, die einen weiteren Abbau des *myo*-Inositolpentakisphosphates (D-Ins(1,2,4,5,6)P5) zeigten. Die beiden Mutanten wiesen eine Mutation eines Glutamates (Glu194) auf. Die Enzyme wurden mehrfach gereinigt und dann der weitere Abbau überprüft. Dabei wurde die PMG-IX-Mutante auch in einer *E. coli*-Phytase (*appA*)-Negativmutante (BL21-1T) exprimiert und gereinigt, um eine Verunreinigung mit

AppA auszuschließen. Die anschließenden Analysen der BL21-1T exprimierten PMG-IV und PMG-IX lieferten die gleichen Ergebnisse, so dass eine Verunreinigung ausgeschlossen werden konnte.

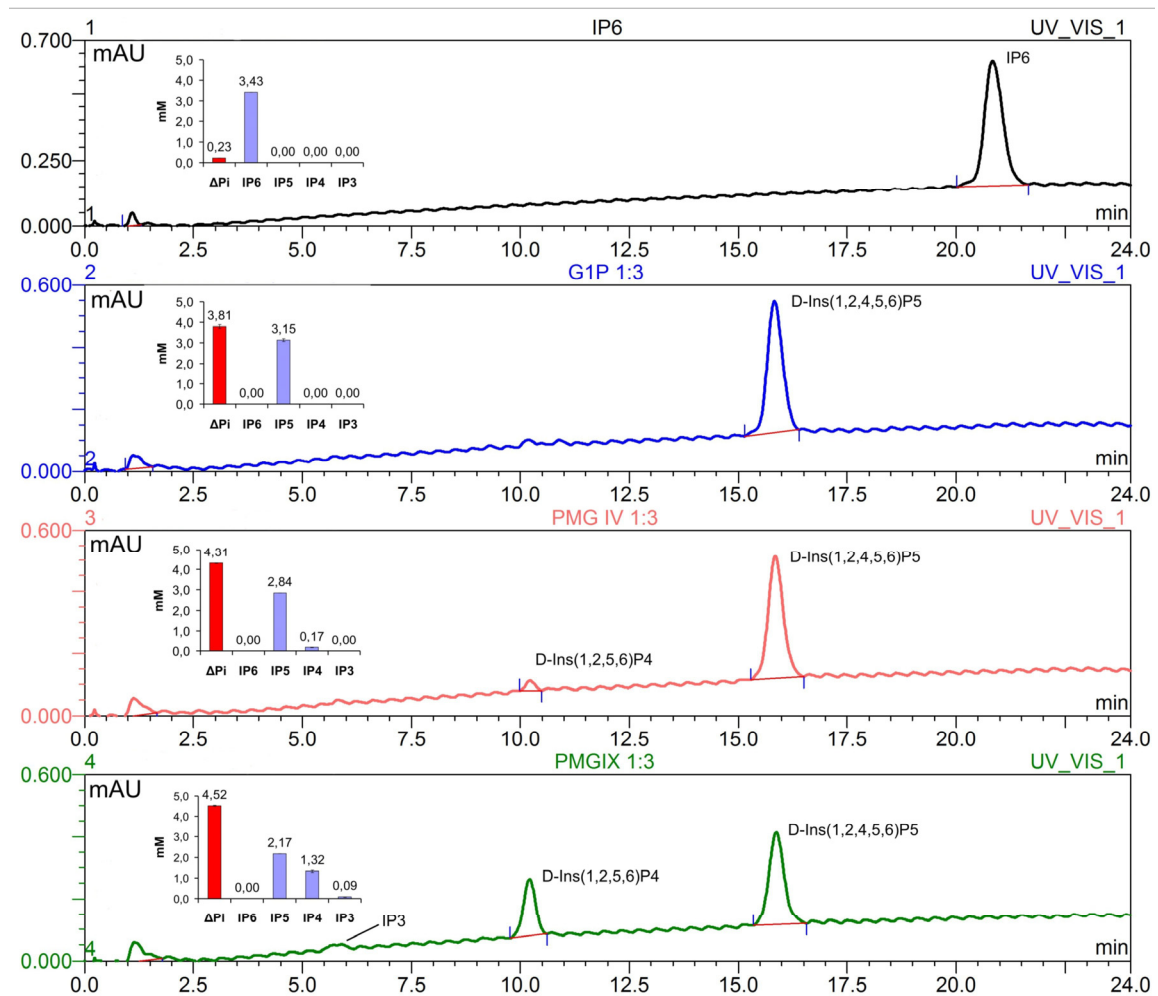


Abbildung 47: Phytatabbau der AgpE-Mutanten (PMG). Dargestellt sind die HPIC-Läufe der Proben IP6 (Kontrolle – InsP6), G1P (AgpE), PMG-IV und PMG-IX. Die InsP6 Probe, eine Phytatprobe, diente als Kontrollprobe und wurde ohne Enzym inkubiert. Die G1P Probe sowie die Proben der beiden Mutanten wurden mit Na-Phytat bei 37 °C, pH 5,0 inkubiert und nach 5 h mit 10 % TCA abgestoppt. Die gestoppten und zentrifugierten Proben wurden direkt in der HPIC analysiert. Parallel wurden die Phosphatfreisetzung nach 5-stündiger Inkubation durch Bestimmung der Phosphatkonzentrationen in den Proben ermittelt und gegen die entstandenen *myo*-Inositolphosphate in einer Grafik aufgetragen. Die native AgpE (G1P) baute Na-Phytat ausschließlich zu D-Ins(1,2,4,5,6)P5 ab. Die Mutanten PMG-IV und PMG-IX zeigten einen weiteren Substratabbau. Anhand der Retentionszeit wurde das Produkt zugeordnet. Wahrscheinlich entstand neben dem IP5-Produkt das *myo*-Inosoltetraphosphat (D-Ins(1,2,5,6)P4). Die höhere Phosphat-konzentrationen der PMG-Proben (roter Balken) zeigten den Abbau über InsP5 hinaus an. Die PMG-Proben besaßen mit 4,31 mM (PMG-IV) und 4,52 mM (PMG-IX) deutlich höhere Phosphatkonzentrationen als die Probe der nativen AgpE (G1P, 3,92 mM).

Die Mutante PMG-IV, in der sich an Stelle des Glutaminrestes ein Lysinrest befand (E194K), spaltete anscheinend den 4-Phosphatrest des entstandenen D-Ins(1,2,4,5,6)P5 ab. Anhand der Retentionszeiten und der Optiphos-Kalibrierung (siehe Anhang) wurde ein

D-Ins(2,3,4,5)P₄ ermittelt, welches aber von dem Abbauprodukt D-Ins(1,2,5,6,)P₄ (Abbildung 47 PMGIV (rot)) nicht unterschieden werden konnte. Die Konzentration wurde mit 0,17 mM bestimmt.

Die Mutante PMG-IX, mit einem Glutamat-Arginin-Austausch (Glu194Arg), zeigte einen stärkeren Abbau zu D-Ins(1,2,5,6,)P₄ und sogar zu InsP₃ (Abbildung 47 PMGIX (grün)). Die Konzentrationen für D-Ins(1,2,5,6,)P₄ wurden mit 1,32 mM und für InsP₃ mit 0,09 mM bestimmt. In weiteren Analysen, in denen gereinigtes D-Ins(1,2,4,5,6)P₅ als Substrat eingesetzt wurde, konnte ebenfalls der weitere Abbau durch die Mutanten PMG-IV und PMG-IX verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt). Beide Mutanten konnten das D-Ins(1,2,4,5,6) P₅, vermutlich durch Hydrolyse des 4-Phosphatrestes, weiter abbauen. Die Bestimmungen der freien Phosphate zeigten, dass durch die Aktivität der Mutanten mehr Phosphat freigesetzt wurde und bestätigten so die HPIC-Analysen. In den Reaktionsansätzen der Mutanten wurden Phosphatkonzentrationen von 4,31 mM (PMG-IV) und 4,52 mM (PMG-IX) ermittelt. Die Phosphatfreisetzung durch die native AgpE wurde mit 3,81 mM bestimmt. Die anderen AgpE-Mutanten (PMG) hydrolysierten, wie die AgpE, nur den 3-Phosphatrest des Phytats zu einem *myo*-Inositolpentakisphosphat, D-Ins(1,2,4,5,6)P₅.

Analysen der generierten Inositolphosphate nach AppA-Vorinkubation durch die AgpE und PMG-IX-Mutante

Die native AgpE und die Mutante PMG-IX wurden auf die Aktivitäten gegenüber anderen Inositolphosphaten, wie Abbauprodukte der AppA, untersucht. Das Phytat wurde mit AppA vorinkubiert und nach Inaktivierung der Phytase erfolgte eine Inkubation mit der nativen Phosphatase und der Mutante PMG-IX.

Die *E. coli*-Phytase AppA zeigte bevorzugt einen Abbau des Phytats zu InsP₅ und weiter zu InsP₄. Der Abbau dieser Produkte verlief dann deutlich langsamer zu den niedrigeren Inositolphosphaten, wie InsP₃, InsP₂ und InsP₁. Es entstanden zwei Inositolpentakisphosphate, das D/L-Ins(1,2,3,4,5)P₅ und D/L-Ins(1,2,4,5,6)P₅. Dabei wurde vorrangig, durch Abspaltung des Phosphatrestes an der C6-Position des Phytats, das D/L-Ins(1,2,3,4,5)P₅ generiert. Weiterhin entstanden zwei Inosoltetraphosphate, das D/L-Ins(1,2,4,5)P₄ und D/L-Ins(1,2,5,6)P₄ bzw. D/L-Ins(2,3,4,5)P₄ (Abbildung 48, G1P n AppA 0min). Es konnte auch hier eine deutliche Dominanz des D/L-Ins(2,3,4,5)P₄ verzeichnet werden.

Das restliche Phytat wurde durch die AgpE innerhalb von 60 min vollständig zu InsP₅ (D/L-Ins(1,2,4,5,6)P₅ hydrolysiert (Abbildung 48). Dieses Produkt wurde, wie schon zuvor beschrieben, nicht weiter gespalten. Das durch die Phytase generierte D/L-Ins(1,2,3,4,5)P₅ wurde durch Abspaltung des 3-Phosphatrestes zu D/L-Ins(1,2,4,5)P₄ abgebaut. Die Inositolphosphate D/L-Ins(1,2,5,6)P₄ bzw. das Isomer D/L-Ins(2,3,4,5)P₄

wurden gering zu InsP3, vermutlich D/L-Ins(2,4,5)P4, umgesetzt. Die AgpE konnte also vorrangig den 3-Phosphatrest der Inositolphosphate abspalten.

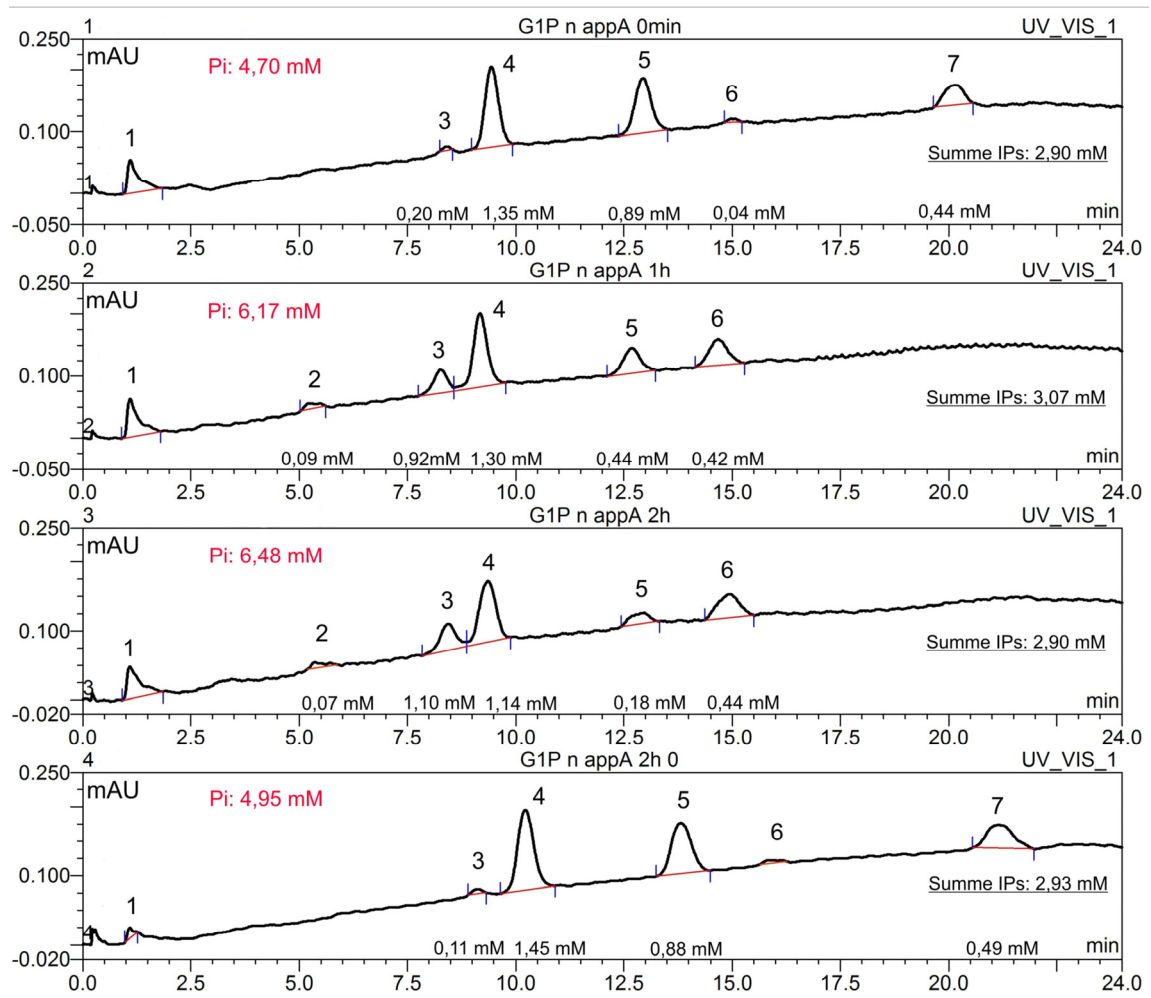


Abbildung 48: HPIC Analyse der durch die AgpE generierten Inositolphosphate nach AppA Vorinkubation. Ca. 3 mM Phytat wurden mit AppA (0,144 µg/ml) in 200 mM Na-Acetat pH 5,0 für 5 min bei 37 °C inkubiert und dann für 10 min bei 95 °C inaktiviert. Es wurden 800 µl des Ansatzes mit 100 µl BSA (2,66 %) und 26 µg (100 µl aqua dest.) AgpE für 1 h (G1P n appA 1 h) und 2 h (G1P n appA 2h) inkubiert. Als Kontrolle dienten eine Probe der AppA-Abbauprodukte (G1P n appA 0min) und eine inkubierte Probe (G1P n appA 2h 0) der Abbauprodukte. Die Proben wurden mit 10 % TCA abgestoppt und in der HPIC analysiert. Peaks: 1: Lösungsmittel und Phosphatpeak; 2: D/L-Ins(2,4,5)P3 / D/L-Ins(1,2,4)P3 / D/L-Ins(1,2,6)P3; 3: D/L-Ins(1,2,4,5)P4; 4: D/L-Ins(1,2,5,6)P4 / D/L-Ins(2,3,4,5)P4; 5: D/L-Ins(1,2,3,4,5)P5; 6: D/L-Ins(1,2,4,5,6)P5; 7: Ins(1,2,3,4,5,6)P6. Die AgpE konnte Abbauprodukte der Phytase AppA weiter abbauen. Zuerst wurden Phytat (Ins(1,2,3,4,5,6)P6) zu D/L-Ins(1,2,4,5,6)P5 und D/L-Ins(1,2,3,4,5)P5 zu D/L-Ins(1,2,4,5)P4 abgebaut. Weiterhin wurde D/L-Ins(1,2,5,6)P4 bzw. D/L-Ins(2,3,4,5)P4 zu InsP3, wahrscheinlich D/L-Ins(2,4,5)P3, D/L-Ins(1,2,6)P3 und D/L-Ins(1,2,4)P3 umgesetzt.

Die Mutante PMG-IX zeigte ebenfalls erst einen Abbau des Phytats zu D/L-Ins(1,2,4,5,6)P5 (Abbildung 49). Dieses Inositolphosphat wurde in zweistündiger Inkubation in geringem Maße umgesetzt. Deutlich schneller erfolgte der Abbau des D/L-Ins(1,2,3,4,5)P5. Vermutlich entstand D/L-Ins(1,2,5,6)P4, das schnell weiter zu InsP3

gespalten wurde. Die Konzentration des D/L-Ins(1,2,5,6)P4 verringerte sich aber nur geringfügig. Die Konzentration des InsP3 stieg aber stark innerhalb der Inkubationsstunde an.

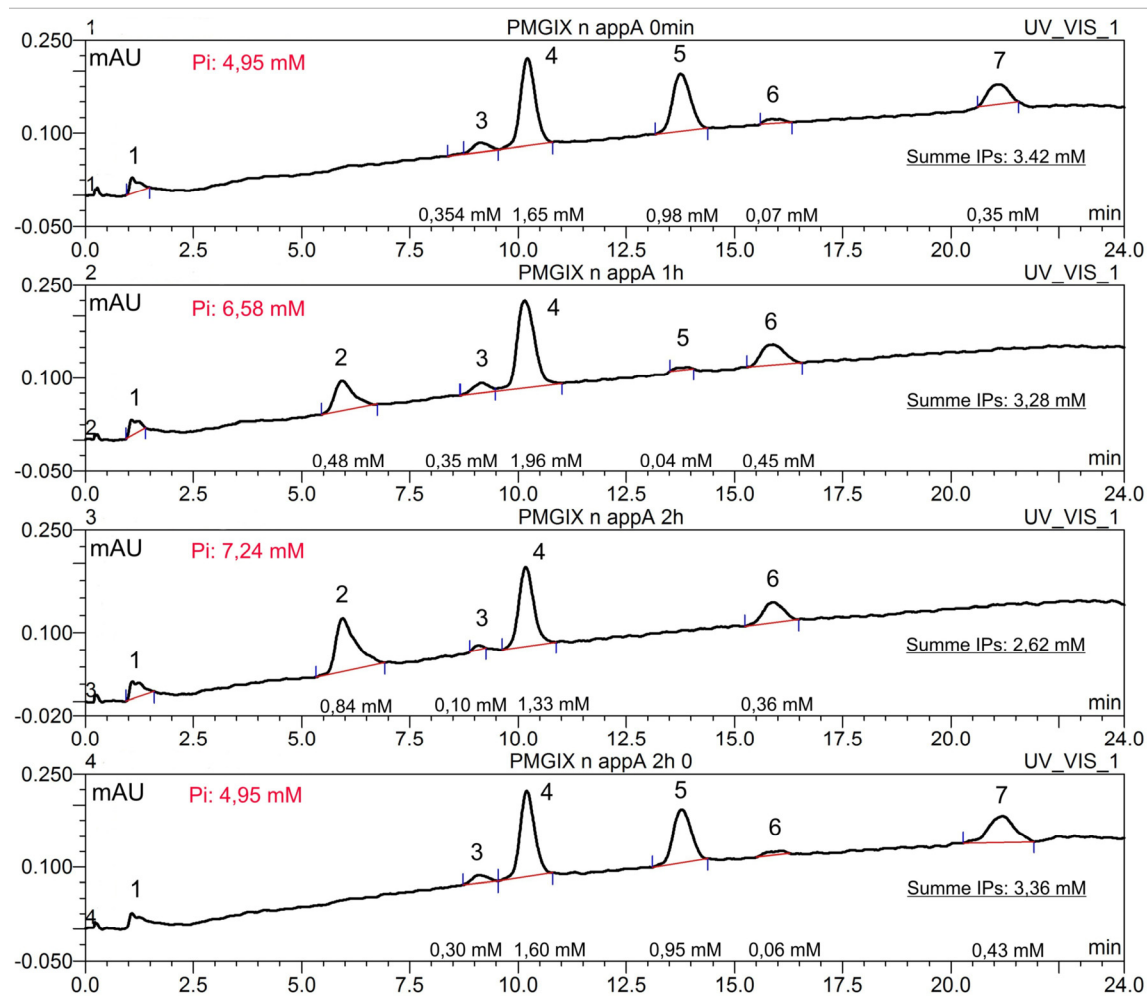


Abbildung 49: HPLC Analyse der durch die AgpE-Mutante PMG-IX generierten Inositolphosphate nach AppA-Inkubation. ca. 3 mM Phytat wurden mit AppA (0,144 µg/ml) in 200 mM Na-Acetat pH 5,0 für 5 min bei 37 °C inkubiert und dann für 10 min bei 95 °C inaktiviert. Es wurden 800 µl des Ansatzes mit 100 µl BSA (2,66 %) und 26 µg (100 µl A. dest.) AgpE für 1 h (PMGIX n appA 1h) und 2 h (PMGIX n appA 2h) inkubiert. Als Kontrolle dienten eine Probe der AppA-Abbauprodukte (PMGIX n appA 0min) und eine inkubierte Probe (PMGIX n appA 2h 0) der Abbauprodukte. Die Proben wurden mit 10 % TCA abgestoppt und in der HPLC analysiert. Peaks: 1: Lösungsmittel und Phosphatpeak; 2: D-Ins(2,4,5)P3 / D-Ins(1,2,4)P3 / D-Ins(1,2,6)P3; 3: D-Ins(1,2,4,5)P4; 4: D-Ins(1,2,5,6)P4 / D-Ins(2,3,4,5)P4; 5: D-Ins(1,2,3,4,5)P5; 6: D-Ins(1,2,4,5,6)P5; 7: Ins(1,2,3,4,5,6)P6. Die Mutante PMGIX baut zuerst Phytat zu D/L-Ins(1,2,4,5,6)P5 ab. Gleichzeitig wurde D-Ins(1,2,3,4,5)P5 zu D-Ins(1,2,4,5)P4 und dann schnell weiter zu D-Ins(1,2,4)P3 oder D-Ins(1,4,5)P3 umgesetzt. Das D-Ins(1,2,4,5,6)P5 wird zu D-Ins(1,2,5,6)P4 und weiter zu D-Ins(1,2,6)P3 abgebaut. Während des Abbaus entstanden InsP3 in hohen Konzentrationen.

Dieser starke Anstieg verdeutlichte die veränderte Substratspezifität der PMG-IX-Mutante gegenüber der nativen AgpE. Die exakte Bestimmung der Konformation des InsP3 konnte mittels dieser HPLC nicht erfolgen. Durch die Hydrolyse des D-Ins(1,2,4,5)P4 entstanden vermutlich entweder D/L-Ins(1,2,4)P3, D/L-Ins(1,2,5)P3 oder D/L-Ins(1,4,5)P3.

Durch Abbau des D-Ins(1,2,5,6)P₄ / D-Ins(2,3,4,5)P₄ wurde demnach ebenfalls D/L-Ins(1,2,5)P₃ und D/L-Ins(1,2,6)P₃ aber auch eventuell D/L-Ins(2,4,5)P₄ gebildet. Somit ist die PMG-IX-Mutante in der Lage aus dem phosphorylierten *myo*-Inositolring weitere Phosphatreste abzuspalten. Lediglich der am C2 gebundene Phosphatrest ist, wie bei den meisten „echten“ Phytasen, nicht durch diese Mutante angreifbar.

2.6. Weitere HPIC-Analysen der Inositolphosphat-Generierung durch Phytasen

2.6.1. Analysen der Phytatabbauprodukte durch die PM22-Phytasemutante in Kombination mit AppA

Die Analysen der generierten Phytatabbauprodukte der *E. coli*-Phytase (AppA) und der *Klebsiella*-Phytase, insbesondere der Phytasemutante PM22, verdeutlichten die grundsätzlich verschiedenen Abbauewege. Die unterschiedlichen Geschwindigkeiten der einzelnen Hydrolyseschritte waren Anstoß für weitere Analysen.

Es wurden Phytaseaktivitäten von 0,05 U/ml für die Analysen verwendet. Das Enzym wurde mit dem Phytat für 120 min inkubiert. Nach 15, 30, 45, 60, 90 und 120 min wurde eine Probe entnommen und diese dann in der HPIC analysiert sowie die Phosphatkonzentrationen bestimmt. Dabei erfolgte die Inkubation jeweils mit AppA, PM22 und in Kombination beider Enzyme, wobei je 0,025 U/ml der Aktivitäten eingesetzt wurden.

Die gleichzeitige Wirkung der PM22 und der AppA führte zu einem AppA-ähnlichen Hydrolysespektrum, bei dem aber nach 120 min die Konzentrationen der einzelnen Inositolphosphate im Vergleich zur normalen Verteilung unterschiedlich waren (Abbildung 50). Durch die AppA wurden das Phytat und die beiden entstehenden Inositolpentakisphosphate (InsP₅) schnell zu zwei Inosoltetraphosphaten (InsP₄) abgebaut. Das *E. coli*-Enzym zeigte, nach der schnellen Abspaltung der ersten beiden Phosphatreste, einen deutlich langsameren Abbau der InsP₄s und InsP₃s. Nach der Inkubation von 120 min wurden InsP-Konzentrationen von 2,85 mM (InsP₄) und 0,27 mM (InsP₃) bestimmt. Der Phytatbbau durch die *Klebsiella*-Phytasemutante PM22 erfolgte kontinuierlich bis zum Inositolmonophosphat (Ins(2)P). Dabei wurden die beiden Inosoltetraphosphate sehr schnell weiter hydrolytisch gespalten (siehe Kapitel 2.4). Nach einer Inkubation von 120 min wurden ca. 1,06 mM Phytat, 0,27 mM InsP₅ und 0,15 mM InsP₃ nachgewiesen. In der Kombinationsanalyse wurden nach 120 min geringere Konzentrationen an Phytat (0,09 mM) und D-Ins(1,2,3,4,5)P₅ (0,17 mM) bestimmt. Weiterhin konnten nur 1,43 mM InsP₄ und 0,39 mM InsP₃ nachgewiesen werden. Somit

wurde der InsP4-Anteil deutlich reduziert, was durch die Wirkung der *Klebsiella*-Phytase zu erklären war. Darüberhinaus führte dies zu einem unvollständigen Abbau von Phytat und InsP5. Es reicherte sich mehr InsP3, wahrscheinlich als Folge des effizienteren InsP4-Abbaus, an.

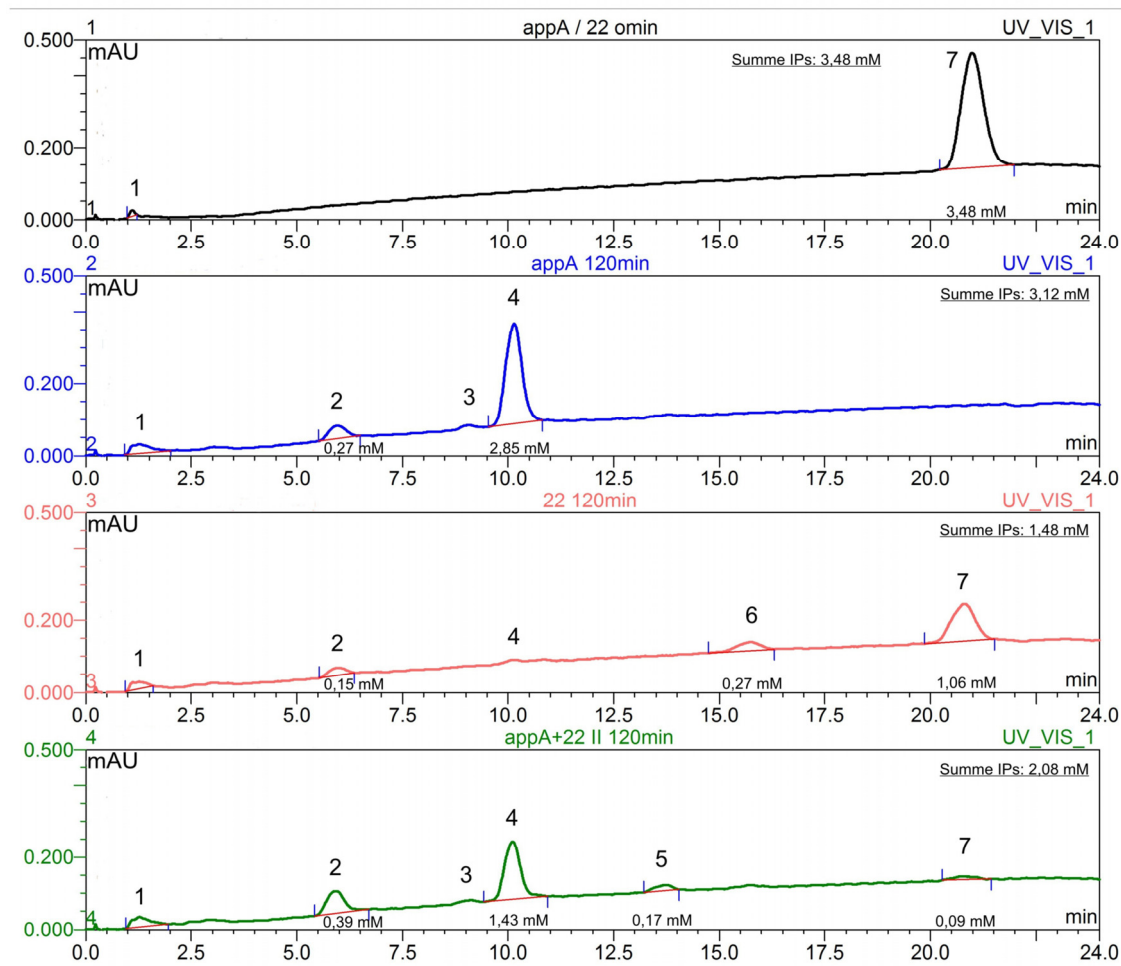


Abbildung 50: Phytatabbau durch Kombination der *Klebsiella*-Phytasemutante PM22 und der *E. coli*-Phytase AppA. Es wurden in den Ansätzen je 0,05 U/ml Phytaseaktivität eingesetzt und mit 3 mM Phytat für 120 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden mit 10 % TCA abgestoppt und in der HPIC analysiert. Ansätze: 1=schwarz: Phytat ohne Zusatz von Phytase; 2=blau: Phytatabbau durch AppA; 3=rot: Phytatabbau durch die Mutante PM22; 4=grün: Kombination aus 0,025 U/ml AppA und 0,025 U/ml PM22. Peaks: 1: Lösungsmittel und Phosphatpeak, Inositolmonophosphat (Ins(2)P; 2: D-Ins(2,4,5)P3 / D-Ins(1,2,6)P3 / D/L-Ins(1,2,4)P3 / D-Ins(1,2,6)P3; 3: D-Ins(1,2,4,5)P4; 4: D-Ins(1,2,5,6)P4 / D-Ins(2,3,4,5)P4; 5: D-Ins(1,2,4,5,6)P5; 6: D-Ins(1,2,4,5,6)P5; 7: Ins(1,2,3,4,5,6)P6. Die ermittelten Konzentrationen der Inositolphosphate (IP's) sind einzeln und als Summe in mM in den Chromatogrammen dargestellt.

Die Phosphatbestimmungen zeigten, dass erst nach 120 min mehr Phosphat (5,9 mM) durch die Kombination der Phytasen freigesetzt wurde (Abbildung 51). Anfänglich (bis 90 min) wurde im Vergleich deutlich mehr Phosphat durch die AppA freigesetzt, was auch die Inositolphosphatbestimmungen widerspiegeln (Daten nicht gezeigt). Es konnte bei der

Kombination eine kontinuierliche Freisetzung des Phosphates gezeigt werden, wie sie auch durch die *Klebsiella*-Phytase erfolgte. Die AppA-Phytase spaltete hingegen vor allem in den ersten Minuten sehr schnell ein bis zwei Phosphatreste vom Phytat ab. Die Geschwindigkeit der Phosphatfreisetzung, durch Spaltung der InsP4- und InsP3-Produkte, wurde jedoch deutlich langsamer mit fortschreitender Inkubationszeit. Dies könnte einerseits auf eine mögliche Produkthemmung zurückzuführen sein, oder an den deutlich geringeren Affinitäten zu den gebildeten Zwischenprodukten liegen.

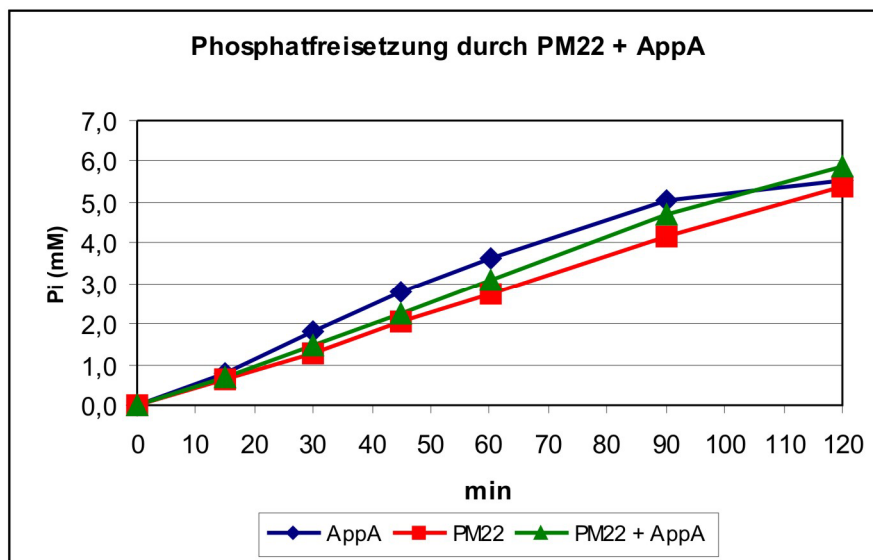


Abbildung 51: Phosphatfreisetzung durch PM22 und AppA sowie in Kombination. Die Bestimmung erfolgte nach Inkubation von Phytat mit 0,05 U/ml der Enzymaktivitäten (AppA oder PM22), oder je 0,025 U/ml der AppA- und PM22-Aktivitäten, mit ca. 3 mM Phytat für 120 min. Die Proben wurden mit 10 % TCA abgestoppt und dann direkt für die Phosphatbestimmung verwendet.

2.6.2. Analysen der Abbauprodukte durch die PM22-Phytasemutante nach AppA-Vorinkubation

Die Inkubation eines unvollständigen Phytatabbaus mit der PM22-Phytasemutante zeigte einen deutlichen effizienteren Abbau im Vergleich zu dem alleinigen Abbau durch die AppA-Phytase. (Abbildung 52).

Die AppA spaltete schnell den 6-Phosphatrest und den 1-Phosphatrest ab. Es entstand ein D-Ins(2,3,4,5)P4-Produkt, das nur langsam abgebaut wurde (Abbildung 52, appA n appA 30 min (rot)). Nach einer Inkubation von 60 min wurden D-Ins(2,3,4,5)P4 und InsP3, D-Ins(2,4,5)P3, im Reaktionsansatz bestimmt (appA n appA 60min). Die Aktivität der Phytasemutante PM22 bewirkte einen schnelleren Abbau des D-Ins(2,3,4,5)P4 –Produkts und des D-Ins(2,4,5)P3 Produkts. Nach 30 min wurden bereits deutlich geringere Konzentrationen der beiden Inositolphosphate nachgewiesen (Abbildung 52, PM22 n appA 30min (blau)). Es wurde zusätzlich Inositoldiphosphat gebildet. Nach 60 min wurde

ein annähernd vollständiger Abbau, der durch die *E. coli*-Phytase generierten Abbauprodukte, verzeichnet (Abbildung 52, PM22 n appA 60min (blau)).

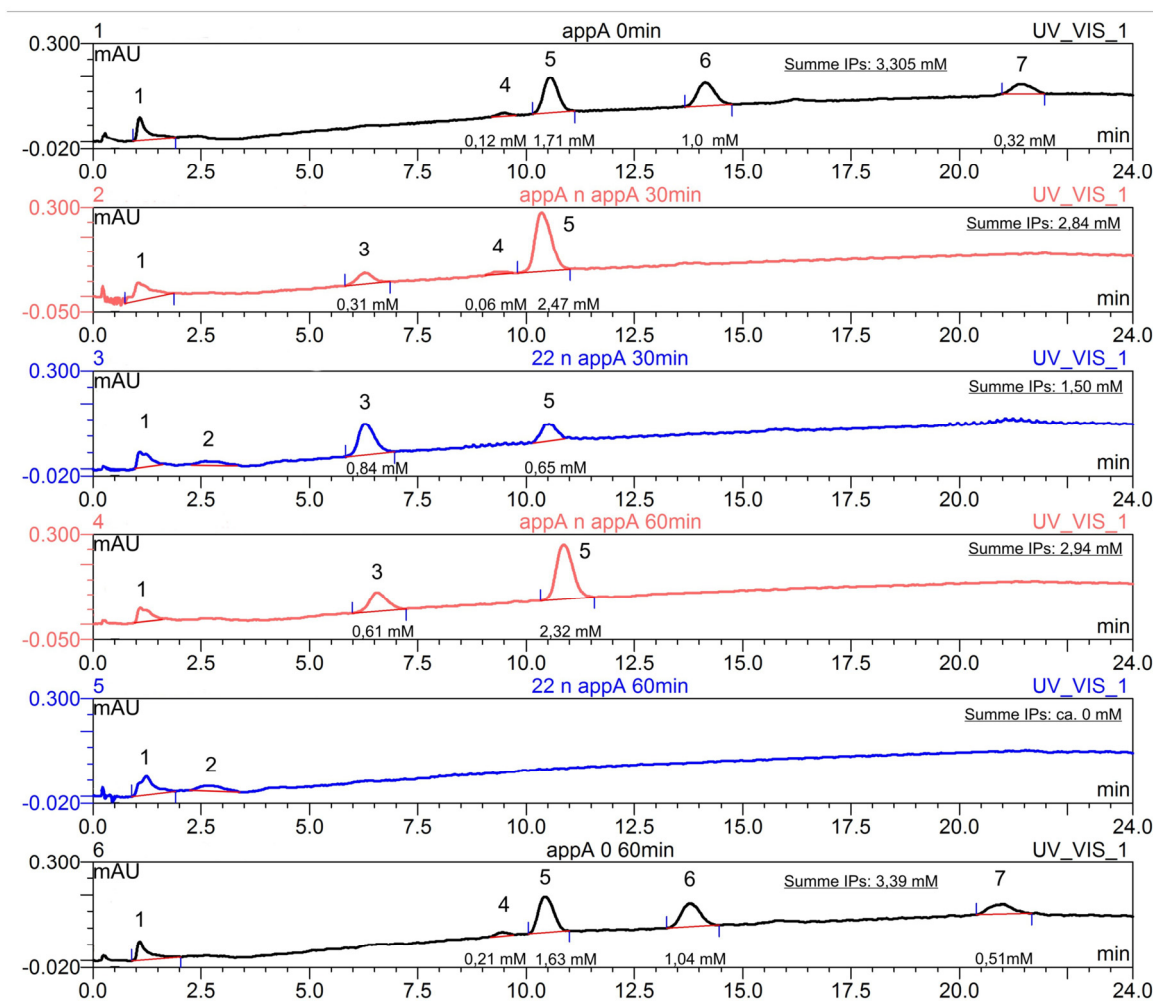


Abbildung 52: Analysen der AppA generierten Phytatabbauprodukte durch die PM22-Mutante. Phytat wurde mit AppA bei 37 °C inkubiert und nach 5 min wurde das Enzym bei 95 °C für 10 min inaktiviert. Je 0,05 U/ml (100 µl) der PM22-Phytase (blau) oder der AppA (rot) sowie 100 µl BSA (2,66 %) wurden mit 800 µl des abzentrifugierten Ansatzes für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden mit 10 % TCA abgestoppt und in der HPIC analysiert. Peaks: 1: Lösungsmittel und Phosphatpeak, Inositolmonophosphat (Ins(2)P); 2: D-Ins(1,2)P2 / D-Ins(2,4)P2; 3: D-Ins(2,4,5)P3 / D-Ins(1,2,4)P3 / D-Ins(1,2,6)P3; 4: D-Ins(1,2,4,5)P4; 5: D-Ins(1,2,5,6)P4 / D-Ins(2,3,4,5)P4; 6: D-Ins(1,2,4,5,6)P5; 7: Ins(1,2,3,4,5,6)P6.

Die Phosphatkonzentrationsbestimmungen der Proben bekräftigten die Ergebnisse der HPIC-Analysen (Abbildung 53). Nach 30 min wurde durch die Wirkung der PM22-Phytaseaktivität ca. 3,5 - 4,5 mM Phosphat freigesetzt. Die AppA spaltete hingegen nur ca. 2,5 - 3 mM Phosphat von den Inositolphosphaten der Phytatabbauprodukte ab. Im AppA-Reaktionsansatz wurde nach 60 min eine Konzentration von ca. 8 mM Phosphat bestimmt. Damit wurden durch die *E. coli*-Phytase zusätzlich 4 mM Phosphat von den Phytatabbauprodukten hydrolysiert. Die *Klebsiella*-Phytasemutante spaltete hingegen ca. 8 mM Phosphat in 60 min ab.

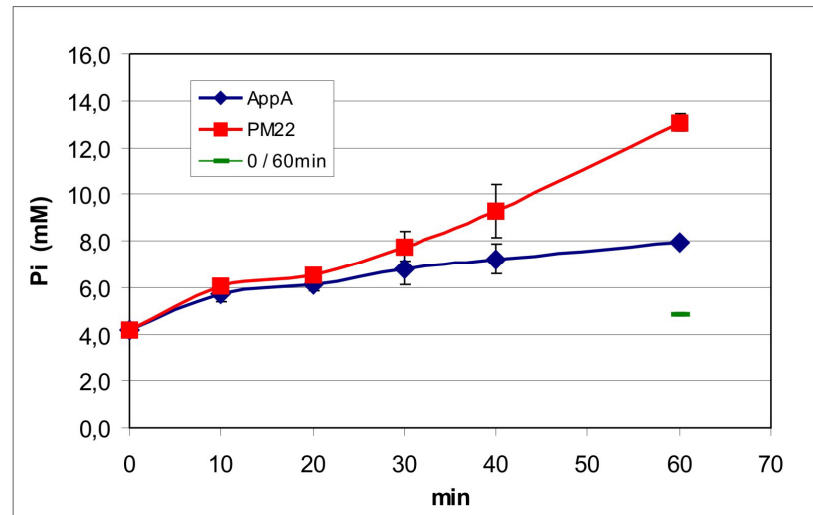


Abbildung 53: Phosphatkonzentration in den Inkubationsansätzen der AppA (blau) und der PM22 (rot) nach Hydrolyse der AppA generierten Phytatabbauprodukte (Abbildung 52). Die Werte wurden als Doppelbestimmungen ermittelt und sind mit der Standardabweichung dargestellt.

3. Diskussion

3.1. Die Phytase aus *Klebsiella pneumoniae*

3.1.1. Einfluss des His-Tags auf die biochemischen Eigenschaften der *Klebsiella*-Phytase

Die *Klebsiella*-Phytase wurde in zwei verschiedenen Expressionssystemen, in einem *E. coli* – und in einem Hefe-Expressionssystem, exprimiert.

Im *E. coli*-Expressionssystem konnte das Enzym sowohl aus dem Lysat als auch aus dem Kulturüberstand gewonnen werden. Mittels des His-Tags konnte das Protein effizient gereinigt werden, allerdings beeinflusste der His-Tag die Aktivität und die Thermostabilität des Enzyms erheblich. Einen ähnlichen Effekt hatte bereits Sajidan *et al.* beschrieben (Sajidan *et al.*, 2004). In dieser Arbeit konnte eine spezifische Aktivität von ca. 380 U/mg für das getaggte Protein und ca. 480 U/mg für das ungetaggte, in *Arxula* exprimierte Protein, bestimmt werden. Die katalytische Effizienz des in *Arxula* exprimierten Enzyms (K_{cat}) war ebenfalls deutlich höher und das Enzym wies eine ca. 5 °C höhere Thermostabilität auf. Die Thermostabilität wird häufig durch eine Glykosylierung erhöht. Für die in Hefe exprimierte Phytase konnte allerdings keine Glykosylierung nachgewiesen werden. Zudem würde eine Glykosylierung eher zu niedrigeren spezifischen Aktivitäten führen, was hier nicht verzeichnet wurde. Deshalb ist die verringerte Thermostabilität des *E. coli*-exprimierten Enzyms vermutlich auf den His-Tag zurückzuführen. Der His-Tag kann durch dessen Größe und Ladung einen Einfluss auf die Tertiärstruktur des Enzyms, resultierend in der niedrigeren Aktivität und Thermostabilität, ausüben (Freydank, Brandt & Drager, 2008). Der C-terminale His-Tag lag, begründet durch die Daten der Kristallstruktur, relativ frei. Dennoch könnte er eine mögliche Dimerbildung negativ beeinflussen. Einige andere saure Histidinphosphatasen, wie die Glukose-1-Phosphatase, welche strukturell große Ähnlichkeiten zu den Phytasen aufweist, liegen in der nativen Form als Dimere vor (Herter *et al.*, 2006). Eine Dimerbildung der His-getagkten *Klebsiella*-Phytase konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, dies könnte durch den Poly-His-Tag begründet sein. Im Proteinkristall lagen zwei bzw. vier Moleküle in der Einheitszelle vor, was ein Hinweis für die Polymerbildung sein könnte. Weiterhin deuteten nicht gezeigte Gelfiltrationsdaten auf eine Tendenz zu einer Dimerisierung hin.

Hier stellt sich die Frage, ob die Expression in Hefen nicht vorteilhafter wäre, um enzymatisch aktiveres Protein zu erhalten. Hierbei wird das Protein aus dem Kulturüberstand chromatographisch gereinigt. Allgemein werden Hefen als gute

Expressionssysteme für die Phytaseproduktion beschrieben. So wurden nach Phytaseexpressionen in *Pichia pastoris* Aktivitäten in den Kulturüberständen von 319 U/ml (*Yersinia*-Phytasen), 219 U/ml (*E. coli*-Phytase) und 16 - 270 U/ml (*Aspergillus niger* Phytase) (Huang *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2007) ermittelt. In dieser Arbeit wurde die Phytaseexpression im *Arxula*-Expressionssystem untersucht und dabei eine vergleichsweise geringe Expression (1 U/ml) erzielt. Die Ursachen hierfür sind möglicherweise das nicht angepasste „codon usage“ des Phytasegens sowie das hierbei verwendete eigene Signalpeptid der Phytase. Die Optimierung des „codon usages“ an die Hefe in Kombination mit einem hefeeigenen Signalpeptid könnte zu einer verbesserten Expression und Ausbeute führen. Die Untersuchung und nachfolgende Anwendung alternativer Hefeexpressionssysteme, wie *Pichia pastoris* oder *Saccharomyces*, wären eventuell weitere Möglichkeiten, um das Expressionsniveau der *Klebsiella*-Phytase zu erhöhen.

Die in dieser Arbeit gemessenen spezifischen Aktivitäten der *Klebsiella*-Phytase waren deutlich höher und der *K_m*-Wert (0,046 mM) deutlich niedriger als die bisher beschriebenen kinetischen Parameter (ca. 200 U/mg, *K_m* 0,28 mM) (Sajidan *et al.*, 2004). Erst nach der Zugabe von BSA mit mindestens einer Konzentration von 80 µg/ml wurden reproduzierbare konstante Aktivitätswerte bestimmt, dass die Untersuchungen zum Einfluss von BSA auf die Enzymaktivität verdeutlichten. Zudem wurden durch den Zusatz von BSA unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration auch höhere Messwerte im Phytasetest ermittelt.

3.1.2. Struktureller Vergleich der *Klebsiella*-Phytase mit anderen sauren Histidinphosphatasen

Die Struktur der sauren Histidinphosphatasen (HAPs) ist evolutionär sehr konserviert. Die Phytasen aus *Klebsiella* und *E. coli* besitzen 25,1 % Aminosäuresequenzidentität und 40,5 % ähnliche Aminosäuren (Sajidan *et al.*, 2004). Mit Hilfe des Dali-Servers (Protein Structure 3D Database Searching by Dali Server (DaliLite v.3) -Institute of Biotechnology (University of Helsinki)) wurde die Struktur der *Klebsiella*-Phytase mit bekannten Proteinstrukturen verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt. Der Strukturvergleich zeigte erwartungsgemäß eine hohe Ähnlichkeit zur *E. coli*-Phytase (Z-Score 46,8). Die Glukose-1-Phosphatase (G1Pase) besitzt mit 27 % eine ähnlich hohe Aminosäuresequenzidentität zur *Klebsiella*-Phytase wie die *E. coli*-Phytase. Im strukturellen Vergleich wurde ebenfalls ein hoher Z-Score von 41,9 bestimmt. In den Strukturen, insbesondere in den α -Domänen der beiden Phytasen und der G1Pase, ist als Besonderheit ein β -Pin-Motiv, welches aus zwei antiparallel verlaufenden β -Faltblättern gebildet wird, zu erkennen (Lee *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2000). Alle anderen Strukturen der

HAPs zeigten dieses Motiv nicht. Dies wird, neben einigen Abweichungen in dem Verlauf der C^α-Kette, ein Grund für die hohe strukturelle Ähnlichkeit zwischen den beiden Phytasen und der G1Pase sein.

Tabelle 12 Strukturelle Übereinstimmungen von der *Klebsiella*-Phytase mit Molekülen der Proteindatenbanken. Erstellt durch die "Proteine Structure 3D Database" Searching by Dali Server (DaliLite v.3 -Institute of Biotechnology (University of Helsinki)).

Molekül	PDB file	Z-Score	rmsd "root mean square deviation"	berücksichtigte AS-Reste	AS-Reste gesamt	% Identität
Phytase (<i>E.Coli</i>)	1dkl-B / 1dkm-A	46.8 / 46.2	2.2 / 2.3	376 / 378	402 / 410	25 / 25
G1Pase (<i>E.Coli</i>)	1nt4-A / 1nt4-B	41.9 / 41.8	2.4 / 2.3	361 / 358	391 / 391	27 / 27
saure Phosphatase (human)	2hpa-D / 2hpa-B	28.7 / 28.6	3.3 / 3.3	307 / 308	342 / 342	20 / 19
	1nd6-B / 1nd5-A	28.7 / 28.7	3.3 / 3.2	307 / 307	342 / 342	20 / 19
	1rpa	28.5	3.3	308	342	19
	1cvi-D / 1cvi-C	28.3 / 28.2	3.3 / 3.4	310 / 308	342 / 342	19 / 19
saure Phosphatase (Ratte)	1rpt	28.0	3.3	309	342	19
saure Histidin-Phosphatase (<i>Francisella tularensis</i>)	2glc-A / 2gla-A	27.2 / 27.2	3.5 / 3.6	303 / 304	327 / 329	19 / 19
	2p36-A	27.1	3.6	304	327	19
	2glb-A	27.1	3.5	303	327	19
Phytase (<i>A.niger</i>)	1qfx-B / 1qfx-A	22.3 / 21.9	3.5 / 3.5	305 / 305	443 / 441	16 / 18
Phytase (<i>D. castellii</i>)	2gfi-A / 2gfi-B	21.8 / 21.7	3.3 / 3.3	310 / 309	458 / 458	16 / 16
Phytase (<i>A. fumigatus</i>)	1sk8-A / 1sk9-A	21.6 / 21.5	3.4 / 3.5	297 / 302	435 / 435	14 / 14
	1qwo-A	21.4	3.5	301	435	14
	1skb-A / 1ska-A	21.3 / 21.0	3.6 / 3.5	303 / 296	435 / 435	14 / 15
Phytase (<i>A. ficuum</i>)	1ihp	21.0	3.6	298	434	15
Phosphatase (<i>Bacillus stearothermophilus</i>)	1h2e-A	10.1	3.9	162	207	15

Die *Klebsiella*-Phytase besitzt auch eine erstaunlich hohe strukturelle Ähnlichkeit zu zwei weiteren, nicht phytatspaltenden Enzymen: der humanen sauren Phosphatase und der sauren Phosphatase der Ratte. Für diese beiden sauren Phosphatasen wurden Z-Scores von 28,7 und 28,0 ermittelt. Interessant ist die Tatsache, dass diese beiden Phosphatasen eine höhere strukturelle Identität zur *Klebsiella*-Phytase aufweisen als beispielsweise die funktionell ähnlicheren Pilz-Phytasen. Für die *Aspergillus*-Phytasen wurden nur Z-Scores von 22,3 - 21,0 bestimmt.

Grundsätzlich scheint die α/β -Domäne mit den β -Faltblättern mehr als die α -Domäne konserviert zu sein, was die größeren Ähnlichkeiten beim Vergleich dieser Domänen zeigen (Ortlund, LaCount & Lebioda, 2003) (Xiang *et al.*, 2004). Diese Domäne bildet das Rückgrat der Struktur und bestimmt die Stabilität des Proteins stärker als die α -Helices. Die Anzahl und Lage der Helices ist innerhalb der HAPs teilweise sehr verschieden. Dennoch werden letztlich die Aktivitäten und Substratspezifitäten durch Bildung des katalytischen Zentrums aus den α -Helices bestimmt (Kostrewa *et al.*, 1997; Kostrewa *et al.*, 1999). Die aktiven Zentren bilden eine katalytische Grube und unterscheiden sich jedoch in Form, Größe und Ladungsverteilung. Das aktive Zentrum der Glukose-1-Phosphatase aus *E. coli* ist im Vergleich zu den Phytasen aus *Klebsiella* und *E. coli* deutlich kleiner. Dennoch wird das Phytat gebunden und ein Phosphatrest hydrolysiert (Lee *et al.*, 2003). Die Anzahl der stabilisierenden Disulfidbrücken variiert ebenfalls unter den sauren Histidinphosphatasen. Die *Klebsiella*-Phytasen besitzt drei Disulfidbrücken,

wobei alle Cysteinreste involviert sind. Die *E. coli*-Phytase weist dagegen vier Disulfidbrücken und die humane saure Phosphatase nur eine Disulfidbrücke auf.

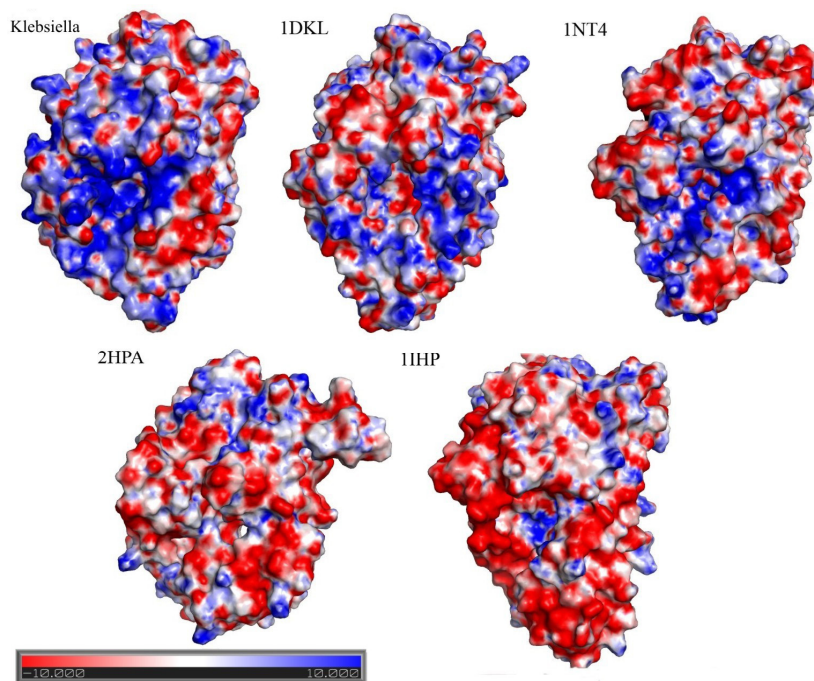


Abbildung 54: Elektrostatische Oberflächenpotentiale der *Klebsiella*-Phytase, der *E. coli*-Phytase (pdb:1DKL), der *E. coli*-Glukose-1-Phosphatase (pdb:1NT4), der humanen sauren Prostata-Phosphatase (pdb: 2HPA) und der Phytase aus *Aspergillus ficuum* (pdb: 1IHP). Die Berechnungen erfolgten mit dem APBS-Tool und Pymol 0.99 in einem Potentialbereich von -10V bis +10 V. Positiv geladene Reste sind blau und negativ geladene Reste rot dargestellt.

Das elektrostatische Oberflächenpotential der *Klebsiella*-Phytase zeigt zahlreiche positiv geladene Reste. Eine besonders stark positiv geladene Region befindet sich im und um das aktive Zentrum, das zwischen den beiden Domänen eingebettet ist (Abbildung 18). Im Vergleich zu anderen Phytasen und Phosphatasen sind diese Regionen hier stärker positiv geladen (Abbildung 54). Das negativ geladene Phytat wird bei saurem pH-Wert und in der metallfreien Form sehr gut mit den zahlreichen positiven Resten der *Klebsiella*-Phytase Wechselwirkungen eingehen können. Dies könnte auch ein Grund für die verzeichnete starke Substrathemmung durch Phytat sein. Bei hohen Konzentrationen binden die Phytatmoleküle unspezifisch an den zahlreichen positiven Resten und behindern den Zugang zum aktiven Zentrum. Dies wirkt sich negativ auf die Enzymaktivität aus, was bei der *K_m*-Bestimmung deutlich erkennbar war. Bereits bei sehr niedrigen Phytatkonzentrationen, von 0,6 mM, konnte eine Substrathemmung verzeichnet werden. Für die Phytase aus *Aspergillus ficuum* wurde ebenfalls eine Substrathemmung bei einer Phytatkonzentration von 2 mM beschrieben (Ullah, 1988). Unter Berücksichtigung der stärkeren positiven Ladung der *Klebsiella*-Phytase im Vergleich zu dieser *Aspergillus*-Phytase lässt sich die Hemmung der *Klebsiella*-Phytase durch die wesentlich niedrigeren Phytatkonzentrationen gut erklären.

3.1.3. Vergleich mit der *E. coli*-Phytase

3.1.3.1. Das aktive Zentrum

Das katalytische Zentrum der *Klebsiella*-Phytase ist mit ca. 14 Å x 17 Å etwas kleiner als das Zentrum der *E. coli*-Phytase, welches eine Dimension von ca. 14 Å x 20 Å besitzt. In das aktive Zentrum der *Klebsiella*-Phytase ragen zudem zahlreiche AS-Reste (Lys198, Lys135, Asn253) und verkleinern so den Zugang für das ca. 10 Å große Phytatmolekül zum aktiven Zentrum. Dies ist beispielsweise bei der *E. coli*-Phytase nicht so stark ausgeprägt.

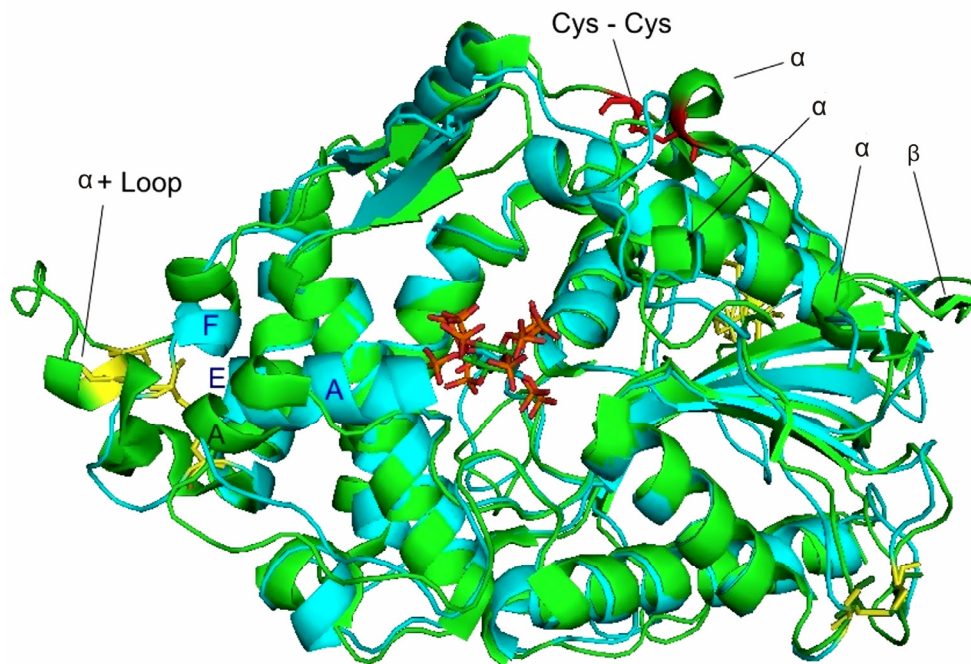


Abbildung 55: Überlagerung der Kristallstruktur der *Klebsiella*-Phytase (blau) mit der Struktur der *E. coli*-Phytase (grün). Gekennzeichnet sind die zusätzlichen kleinen α -Helices und (α) und Faltblätter (β) in der α/β -Domäne, ein α -Helix-Loop-Bereich (α + Loop) und die zusätzliche Disulfidbrücke (Cys-Cys) in der *E. coli*-Phytase. Die drei Disulfidbrücken sind in beiden Molekülen gelb dargestellt.

Die meisten α -Helices und das typische β -Faltblattmotiv sind in beiden Molekülen vorhanden und befinden sich in den gleichen Positionen. Im Unterschied zur *E. coli*-Phytase ist die α -Helix A bei *Klebsiella* deutlich verlängert (Abbildung 55) und ragt tiefer in das aktive Zentrum. Auf dieser Helix liegt der Tyrosinrest, Tyr31, der eine H-Brücke zum Substrat ausbildet. Besonders in dieser Region, von Tyr31 bis Gln36, zeigt die *Klebsiella*-Phytase eine deutliche Abweichung in der AS-Sequenz zu anderen phytatspaltenden sauren Histidinphosphatasen (siehe Proteinalignment). Der N-Terminus zeigt direkt mit dem Tyr31 in das aktive Zentrum und bestimmt so die Substratbindung. Die verlängerte Helix stabilisiert zusätzlich das katalytische Zentrum, macht dies aber auch weniger flexibel für substratinduzierte Konformationsänderungen.

Der Vergleich der Proteinstrukturen der beiden Phytasen zeigte, dass in der *Klebsiella*-Phytase einige kleinere β -Faltblätter in der α/β -Domäne, ein Loop und eine α -Helix in der α -Domäne zwischen α -Helix E und F nicht vorhanden sind (Abbildung 55). Das Fehlen einer Disulfidbrücke beeinflusst vermutlich die Aktivität der *Klebsiella*-Phytase nicht, könnte aber von Bedeutung für die Thermostabilität des Enzyms sein. In der *E. coli*-Phytase befindet sich diese zusätzliche Disulfidbrücke am Rand der α/β -Domäne und stabilisiert das Enzym (Abbildung 55).

3.1.3.2. Die veränderte Phytatbindung in der *Klebsiella*-Phytase

Im Molekül der inaktiven Phytasemutante waren drei Elektronendichten, die höchstwahrscheinlich vom Phytat stammen, erkennbar. Dabei befand sich eine gut definierte Elektronendichte in direkter Nähe zum mutierten Alaninrest Ala25. Unter Berücksichtigung der weiteren zwei Elektronendichten wurde das Phytat mit dem 3-Phosphatrest in die Bindungstasche modelliert. Offensichtlich wird nur der 3-Phosphatrest stark gebunden. Die beiden Phosphatreste P1 und P4 werden wesentlich schwächer fixiert, das auf eine flexible Bindung des Phytats im aktiven Zentrum hinweist. Dadurch ist die Elektronendichte des *myo*-Inositolrings nicht oder nur begrenzt identifizierbar. Diese flexible Bindung könnte mittels NMR-Analysen überprüft werden und so gleichzeitig auch zur Identifizierung weiterer möglicher Bindungspositionen führen.

Die Lage des Phytats ist in den Kristallstrukturen der PhyK und der AppA identisch. Wie bei der *E. coli*-Phytase erfolgt die Phytatbindung über ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brückenbindungen). Für die Bindung aber auch Abspaltung des Phosphatrestes ist vor allem die richtige Positionierung der beiden Histidinreste His25 und His290 durch Wasserstoffbrücken (H-Brücken) zu Gly26 und Ser96, notwendig (Abbildung 19). In der *E. coli*-Phytase (AppA) erfolgt diese Positionierung der Histidinreste His17 und His303 über H-Brücken zum Gly18 und Asp88 (Lim *et al.*, 2000). Das Phytat wird besonders stark über den 3-Phosphatrest in beiden aktiven Zentren fixiert, nimmt jedoch nicht den gesamten Raum ein (Abbildung 19). Dieser 3-Phosphatrest wird in der *Klebsiella*-Phytase durch H-Brücken zu den Aminosäuren Arg24, Arg28, Arg100, His290, Asp291 und Thr292 gebunden. Die Position und Orientierung dieser zuvor benannten AS-Reste ist in anderen sauren Histidinphosphatasen, darunter Phytasen (*Aspergillus*, *E. coli*) und Phosphatasen, (humane saure Phosphatase) konserviert (Kim *et al.*, 2003; Kostrewa *et al.*, 1999; LaCount, Handy & Lebioda, 1998; Lim *et al.*, 2000). In der *E. coli*-Phytasestruktur wird der 3-Phosphatrest ebenfalls stark über H-Brücken zu den konservierten Resten gebunden. Obwohl diese Phytase eine 6-Phytase darstellt, war aber in der Kristallstruktur der 3-Phosphatrest im aktiven Zentrum erkennbar. Unabhängig davon waren die homologen drei Arginine Arg16, Arg20, Arg92, sowie His303 und Asp304 für die H-Brückenbildung

In der *E. coli*-Phytase sind demnach die Phosphatreste 2,4 und 5 über mindestens je zwei reine H-Brücken fixiert. Dies stellt eine stärkere Bindung des Phytats als in der *Klebsiella*-Phytase dar.

91

änderungen durch Bindung des Phytats verzeichnet. Die Konformation der *Klebsiella*-Phytase ähnelt, sowohl mit als auch ohne Phytatbindung, der geschlossenen Konformation der *E. coli*-Phytase. Für die anderen Phytasen, mit geringeren spezifischen Aktivitäten, wie die *Aspergillus*-Phytasen wurde ebenfalls keine Substrat induzierten Konformationsänderungen beschrieben (Kostrewa *et al.*, 1997; Kostrewa *et al.*, 1999; Xiang *et al.*, 2004).

Somit ist zu vermuten, dass in der *E.coli*-Phytase neben der stärkeren Bindung des Phytats, der bessere Zugang zum aktiven Zentrum durch den Wechsel zwischen einer offenen und geschlossenen Konformation die höhere spezifische Aktivität bestimmt.

3.1.3.3. Die Abbauwege der Phytasen aus *Klebsiella* und *E. coli*

Die Ausbildung zusätzlicher H-Brücken in der *E. coli*-Phytase könnte den schnelleren Abbau des Phytat zu InsP5 und InsP4, der bei den HPIC-Analysen verzeichnete wurde, erklären. Im *Klebsiella*-Phytasemolekül könnte erst eine stärkere Fixierung der Phytatabbauprodukte, wie InsP4 und InsP3, erfolgen, was durch die geringe Konzentration der InsP4-Produkte bei der Phytatspaltung gezeigt werden konnte. Die Bindung des Phytats erfolgt, trotz der sehr ähnlichen Struktur, bei beiden Phytasen durch unterschiedliche Reste, was für das Phytat sichtbar wurde. Das Phytatabbauprodukt D-Ins(1,2,4,5,6)P5 wird zudem scheinbar bei der *Klebsiella*-Phytase, in zwei verschiedenen Positionen gebunden, was durch die Bildung der zwei isomeren InsP4-Formen sichtbar war. Die unterschiedlichen Substratspektren der beiden Phytasen werden demnach durch die verschiedenen Bindungsstellen für Phytat und für die anderen Abbauprodukte bestimmt. Anscheinend wird die 3- oder 6-Phytaseaktivität durch die Bindung des Phytats, insbesondere über den 2-Phosphatrest und dessen exponierte Position, bestimmt. Damit ist Tyr292 der *Klebsiella*-Phytase, welcher den 2-Phosphatrest fixiert, von großer Bedeutung. Interessanterweise wurden für die Phytase aus *Raoultella* (*Klebsiella*) *terrigena* zwei Abbauwege mit zwei verschiedenen initialen Phosphatabspaltungen, in der 3- und 4-Position des Phytats gezeigt. Dies äußert sich in den bekannten Haupt- und Nebenabbauwegen (Greiner & Carlsson, 2006). Demnach müssen also zwei mögliche Bindungspositionen für den sterisch „sperrigen“ 2-Phosphaterest existieren. Dabei wird die beschriebene 3-Position bevorzugt. Gleiches gilt für das *E. coli*-Enzym, welches sowohl den 3-Phosphatrest als auch den 6-Phosphatrest initial abspalten kann (Greiner *et al.*, 2001b). In den hier durchgeführten Analysen konnte im Gegensatz zur *E.coli*-Phytase nur ein Abbauweg (Hauptabbauweg) eindeutig gezeigt werden. Damit ist die Existenz eines weiteren Nebenabbauweges fraglich.

3.1.4. Die Bedeutung des H-Brückennetzwerkes für die Aktivität der *Klebsiella*-Phytase

Durch die verschiedenen Aminosäureaustausche wurden deutliche Veränderungen in den Enzymaktivitäten, vorrangig bedingt durch die Beeinflussung des H-Brückennetzwerkes, bewirkt. Die Anzahl der positiven „random“ erzeugten Phytasemutanten im Screening-Test variierte entsprechend der Mutationsorte und lieferte so erste Indizien für die funktionelle Bedeutung der mutagenisierten Reste bei der Ausbildung von H-Brücken (siehe Tabelle 7). Konkretere Aussagen konnten aber erst durch die gezielten Punktmutationen getroffen werden.

3.1.4.1. Die Substratfixierung

Gly26, Ile27 und Pro29

Die Mutationen der AS-Reste Gly26, Ile27 und Pro29 (RP1 und RP2) führten zu einem starken Aktivitätsverlust. Der Glycinrest Gly26 bildet wahrscheinlich eine H-Brücke zum His25 und positioniert diesen Rest. Die Positionierung des aktiven Histidinrestes wird in anderen Phytasen ebenfalls durch einen Glycinrest bewerkstelligt (Lim *et al.*, 2000). In Kombination mit dem Isoleucinaustausch (RP1-25/65) war die Inaktivierung der Phytase, durch das Fehlen der H-Brücke zum Histidinrest, zu verzeichnen. Die sehr geringen Phytaseaktivitäten der Mutanten PM1 bis PM4, in denen das aktive Zentrum der *E. coli*-Phytase erzeugt wurde, zeigten die große Bedeutung der Reste Ile27 und Pro29 für die Aktivität. In anderen Phytasen und Glukose-1-Phosphatasen befindet sich in Position des Ile27 ein Valinrest oder Leucinrest und an Stelle des Pro29 ein Alanin oder Serinrest (Cottrill *et al.*, 2002; Dassa *et al.*, 1982; Kostrewa *et al.*, 1997). Diese beiden Reste, vor allem der Prolinrest, stabilisieren und positionieren die Argininreste und den Histidinrest scheinbar anders als in der *E. coli*-Phytase und sind mitverantwortlich für die veränderte Phytatbindungen der *Klebsiella*-Phytase.

Ala32, Gly33, Asn34

Die untersuchten Aminosäureaustausche Ala32, Gly33 und Asn34 (RP3-Mutationen) resultierten in geringeren Aktivitäten, die aber stark von den Eigenschaften der eingebauten Aminosäuren abhängig waren. Beispielsweise reduzierte der Einbau eines Isoleucins (Ile32, RP3-4, RP3-19) an Stelle des Alanins die Phytaseaktivität nachhaltig. Der AS-Rest Thr31 ist an der Bindung des Phytats durch Ausbildung einer H-Brücke beteiligt und scheint durch den Isoleucinrest sterisch beeinflusst zu werden. Trotz des Phytaseaktivitätsverlustes blieb hier entsprechend die Phosphataseaktivität unbeeinflusst. Ein Austausch von Asn34 zu einem Thr34 (PM6) führte zu einer zweimal höheren Phosphataseaktivität und gleichzeitig zu einer Reduktion der Phytaseaktivität von ca. 380

U/mg auf ca. 100 U/mg. Der Einbau eines weiteren Threonins (Thr34) führte vermutlich zu Wechselwirkungen zwischen den beiden Threoninen, so dass keine H-Brücke zwischen Thr31 und dem 6-Phosphatrest des Phytats ausgebildet werden konnte. In beiden Fällen führte der Austausch einer einzigen Aminosäure zu einer veränderten Substratspezifität. Die Mutation Asn34Thr führte, neben der schlechteren Bindung des Phytats, zu einer besseren Fixierung des pNPPs. Dabei wäre eine H-Brückenbildung zwischen dem Thr34 und der Nitro-Gruppe des pNPPs denkbar.

Asn209

Der zusätzliche Austausch des Asn209 zu einem Leu209 (PM15) verstärkte diese beschriebene Substratspezifitätsverschiebung. Die Phosphataseaktivität erhöhte sich um ca. 300 U/mg, wobei die Phytaseaktivität weiter verringert wurde. Die Doppelmutanten PM19 (Asn34Thr34, Asn209Glu) und PM20 (Asn34Thr34, Asn209Lys) zeigten ebenfalls stark verringerte Phytase-, aber etwa gleiche Phosphataseaktivitäten wie das native Enzym. Damit wird nur die Phosphataseaktivität durch den Asn209Leu-Austausch, also durch den Austausch einer polaren, positiv geladenen AS zu einer unpolaren AS, deutlich erhöht. Der Grund für die verringerten Phytaseaktivitäten beim Austausch des Asn209 liegt in dem Fehlen der H-Brücke zwischen Asn209 und dem 5-Phosphat des Phytats. Wie bedeutsam der Asn209-Rest für die Bindung des Phytates über die H-Brückenbildung zum 5-Phosphat ist, wurde auch durch die verringerten Aktivitäten beim Austausch des Restes gegen Leucin (PM11-Mutante, Asn209Leu) und durch die Mutationen der RP6 deutlich. Die Mutation Asn209Leu in Kombination mit dem Asn34Thr-Austausch resultierte vermutlich in einer Verstärkung der Wechselwirkung zwischen Thr34 und dem pNPP. Der Einbau von Glu (PM19) oder Lys (PM20) an Stelle des Asn209 unterbindet neben der H-Brücke zum Phytat auch die Bindung zum pNPP. Damit beeinflussen vor allem die Ladungen der Seitenketten der eingebauten Aminosäurereste und sterische Wechselwirkungen die Bindung des pNPP.

Die beiden Mutanten PM6 (Asn34Thr) und PM15 (Asn34Thr, Asn209Leu) zeigten neben der veränderten Substratspezifität auch ein verändertes Phytatabbauspektrum. So konnte bei dem hydrolytischen Abbau durch die beiden Phytasen nur ein InsP4-Produkt (D-Ins(1,2,5,6)P4) identifiziert werden. Die Mutation von Asn34 muß demnach auch eine veränderte Substratbindung für Ins(1,2,4,5,6,)P5 oder für die beiden InsP4-Produkte bewirken.

Ser96

Wie bereits beschrieben, ist der Ser96-Rest für die Orientierung des His290 verantwortlich. Die Positionierung ist für die Phytaseaktivität notwendig, was durch die wenigen positiven Mutanten, den geringeren spezifischen Aktivitäten der Phytase nach

Mutationen RP4 (Ser96Asp, Gln99Asn) und der Punktmutation PM9 (Ser96Asp) deutlich wurde. Die fehlende Fixierung des His290 resultiert in einer starken Verminderung der Phytaseaktivität auf 150 U/mg (RP4-68) bzw. 60 U/mg (PM9).

Tyr249

Der AS-Rest Tyr249 bildet offensichtlich eine H-Brücke zum 4-Phosphatrest des Phytats. Der Abfall der Aktivität der Phytasemutanten bis auf 10 % nach der Random-Mutagenese RP9 (Tyr245His/Val/Asn) verdeutlicht die Bedeutung dieser Wasserstoffbrücke. Als eine Folge der Substitution konnte die Phosphatgruppe des Substrats nicht mehr richtig fixiert werden und führte zu diesem deutlichen Aktivitätsverlust.

Einbau positiver AS-Reste

Die Strategie, AS-Reste mit positiv geladenen Seitenketten im aktiven Zentrum zu platzieren, um zusätzlich Phytatbindungsstellen zu schaffen, erzielte keine Erfolge. Dies verdeutlichen die geringen Aktivitäten der PM7- (Leu245His) und PM8-Mutanten (Pro243Ser, Leu245His, Thr246Asn und Glu247Ala). Der Einbau eines His245 an Stelle des Leu245 behinderte offensichtlich die Phytatbindung, obwohl kein Kontakt des Leu245-Restes zum Phytat oder ein Einfluss bei der Phytatbindung in der modellierten Substratbindung ersichtlich war. Eine weitere Bestätigung hierfür lieferten die Mutanten der Random-Mutagenese RP8, bei denen das unpolare Leucin (Leu245) gegen Valin, Arginin bzw. Histidin ausgetauscht wurde. Abhängig von den Eigenschaften der eingebauten AS-Reste konnten Aktivitäten zwischen 30 - 270 U/mg bestimmt werden. Wobei der Austausch zu polaren Aminosäureresten (Arg, His), die Aktivität stark vermindert hat. Diese Mutagenesen verdeutlichten, dass auch der Aminosäureaustausch eines Restes, der augenscheinlich nicht direkt an der Phytatbindung beteiligt ist, einen starken Effekt auf die Aktivität der *Klebsiella*-Phytase ausüben kann.

Zusammenfassung

Die Fixierung der einzelnen Phosphatreste des Phytats erfolgte in der *Klebsiella*-Phytase durch jeweils mindestens eine Wasserstoffbrücke. Bereits das Fehlen einer dieser H-Brücken verringerte deutlich die Aktivität der Phytase, was beispielsweise die Mutationsanalysen der RP9 demonstrierten. Auch andere Mutationen, wie die Substitutionen der Asparaginreste Asn34 und Asn209 (PM6, PM11 und RP6), führten zu starken Aktivitätsverlusten, weil dabei ebenfalls die Ausbildung der H-Brücken beeinflusst wurde. Das vollständige H-Brückennetzwerk zu allen sechs Phosphatresten ist somit Voraussetzung für die effiziente Phytatbindung und für die vermittelte Phytaseaktivität. Das Netzwerk wird zudem direkt oder indirekt über Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureresten beeinflusst. Allerdings wäre es notwendig, die Bedeutung dieser

H-Brücken bei der Bindung der Phytatabbauprodukte zu untersuchen. Um einen vollständigen Abbaumechanismus zu postulieren, sollten die AS-Reste, die mit Phytat und diejenigen, die mit den Abbauprodukten interagieren, identifiziert werden. Hierfür würden sich Aktivitätsmessungen der Phytasemutanten unter Verwendung anderer Inositolphosphate und anschließende HPIC-Analysen besonders gut eignen. Zudem sollten Kristallstrukturanalysen der Phytase mit verschiedenen Inositolphosphaten weitere Rückschlüsse auf die Bedeutung der einzelnen H-Brücken für die Bindung dieser Produkte zulassen und auch zur Identifizierung neuer Bindungsaminoacids führen.

3.1.4.2. Der Zugang zum aktiven Zentrum der *Klebsiella*-Phytase vermittelt eine Aktivitätserhöhung

Der Zugang für das Substrat zum aktiven Zentrum ist ebenfalls, wie die eigentliche Substratbindung, bedeutsam. Einige Reste ragen in die katalytische Kavität oder befinden sich in den Randregionen. Sie kommen wahrscheinlich mit dem gebundenen Phytat nicht in Kontakt. Die AS-Reste Asp134, Lys198 und Arg262 wurden deshalb mutiert, um diese Einflüsse zu untersuchen.

Lys198

In der RP-Mutagenese 5 zeigte sich ein deutlicher Einfluss des Lys198 auf die Aktivität. Die Aktivität der untersuchten drei Mutanten besaßen Aktivitäten zwischen 100 – 150 U/mg, wobei der Einbau von kleineren, ungeladenen AS, wie Alanin und Leucin, die Phytaseaktivität nicht so stark beeinträchtigte (RP5-14). Die Funktion des Lys198 für die Substratleitung in das aktive Zentrum wurde durch die verringerte Aktivität der Mutante PM21 (Lys198Tyr) deutlich. Der Ladungswechsel oder die Lage der Tyrosinseitenkette ist offensichtlich dafür verantwortlich. Der Einbau eines Argininrestes (PM12) bewirkte eine Aktivitätserhöhung. Somit wird ein Einfluss der zusätzlichen Ladung auf die Substratleitung vermutet. Durch die Lage des Restes könnte eine Interaktion der Seitenkette mit dem Substrat vorstellbar sein und das Phytat durch die beiden positiven Ladungen stark angezogen werden. Das Phytat könnte so besser für die Bindung positioniert werden.

Arg262, Asp134 und Lys135

Die Mutation des Arg262 zu einem Glutamatrest (PM13) resultierte in einer starken Reduktion der Phytaseaktivität und betont auch den Einfluss der positiven Ladung des Argininrestes. In der *E. coli*-Phytase AppA bildet dieser Rest (Arg267) eine H-Brücke zum 2-Phosphatrest des Phytats aus. In der Struktur der *Klebsiella*-Phytase ist dies eher unwahrscheinlich, da der Abstand mit 6,63 Å für eine H-Brücke zu groß ist. Die Substitution bewirkte einen Ladungswechsel der Seitenkette, was wahrscheinlich zu einer

Abstoßung des negativ geladenen Substrates oder eines Phytatabbauproduktes führt. Die Mutation des Asp134 zu Serin (PM16) hatte ebenfalls eine deutliche Reduktion der Aktivität zur Folge. Die Mutation des Lys135 zu Glutamat (PM17) bewirkte hingegen eine Erhöhung der Phytaseaktivität um ca. 100 U/mg. Als Folge der Mutation wurde entweder der benachbarte Asp134 nicht mehr abgeschirmt oder eine zusätzliche negative Ladung eingefügt, welche die Phytatbindung positiv beeinflussen könnte. Dadurch würde das Phytatmolekül in Richtung des Lys198 oder Arg198 geschoben und so für die Bindung besser positioniert werden. Die Doppelmutation Lys135Glu Lys198Arg (PM22) führte zu einer weiteren Aktivitätserhöhung um ca. 50 U/mg. Dadurch scheint das Substrat noch besser in das aktive Zentrum zu gelangen. Außerdem scheinen die Reste Lys135 und Lys198 die Substrathemmung zu bestimmen, so dass nach Austausch dieser Reste zu Glu und Arg die Substrathemmung sinkt.

Bedeutung des Randbereiches des aktiven Zentrums

Die Mutationen in den Randbereichen führten zur Reduktion der Aktivitäten, obwohl in der Kristallstruktur keine H-Brücken zum Phytat ersichtlich waren. Diese Reste sind möglicherweise essentiell für die Bindung von Phytat-Abbauprodukten durch H-Brücken. Es ist vorstellbar, dass diese *myo*-Inositolphosphate andere Bindungspositionen in der PhyK einnehmen und so stärker mit den AS-Resten in den Randregionen des aktiven Zentrums wechselwirken als das Phytatmolekül selbst.

Die hier erzeugten aktiveren Phytasevarianten wurden hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften überprüft. Es wurden aber keine Veränderungen der pH-Spektren, Temperaturspektren sowie der generierten Abbauprodukte ermittelt. Allerdings konnten teilweise geringere Konzentrationen einiger Inositolphosphate in den Abbauspektren nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde mehr Phosphat freigesetzt, was auf eine stärkere Hydrolyse hinweist. So konnte bei gleichen Proteinmengen während der ersten Reaktionsminuten bis zu 35 % mehr Phosphat gemessen werden (Abbildung 30). Die ermittelten *K_m*-Werte zeigten kaum Abweichungen, was auf unveränderte Substrataffinitäten zum Phytat schließen lässt. Allerdings sind veränderte Affinitäten zu den einzelnen Phytat-Abbauprodukten nicht auszuschließen, da die *K_m*-Werte aus der Summe von bis zu fünf Hydrolyseschritten ermittelt wurden. Damit könnten einige Phytat-Hydrolyseschritte langsamer oder schneller erfolgen, was dem hier bestimmten *K_m*-Werte nicht zu entnehmen ist. Unter der Berücksichtigung der geringeren Konzentration der InsP4-Abbauprodukte, könnte die Mutante PM22 durchaus eine höhere Affinität zum InsP4 besitzen als das ursprüngliche Enzym.

Die Substratkonzentration hatte einen deutlichen Einfluss auf die Aktivitäten sowohl der nativen als auch der mutierten Phytasen und führte zur einer Substrathemmung (siehe Tabelle 8). Die Mutationen Asp134, Lys198 und Arg262 könnten, wie bereits beschrieben,

neben der besseren Bindung einzelner Phytat-Abbauprodukte auch zu einer Herabsetzung der Substrathemmung geführt haben. Dadurch könnte der Zugang zum aktiven Zentrum bei dem Phytasemutanten weniger stark von unspezifisch gebundenen Phytatmolekülen behindert werden.

3.1.5. Die Anwendung der *Klebsiella*-Phytase in der Tierernährung

Derzeit werden bereits Phytasen aus *E. coli* und *Aspergillus* Spezies produziert und in der Tierernährung eingesetzt. Trotzdem sucht man weiter nach besser geeigneten Enzymen, die den hohen Anforderungen der Massentierhaltung genügen. Hierbei sind Eigenschaften wie die Thermostabilität, pH-Stabilität und enzymatische Effizienz wichtig. Die gesuchten Phytasen sollen nicht nur das Phytat effizient und möglichst schnell hydrolysieren, sie müssen auch die Magenpassage und damit den niedrigen pH-Wert überstehen, um im Darm, also bei neutralem pH-Wert, ihre Aktivität zu entfalten. Bislang erfüllt keine der bekannten Phytasen alle diese Kriterien, deshalb werden die meisten Präparate vor der Verfütterung auf das Futtermittel aufgetragen, was allerdings nicht sehr effizient das im Phytat gebundene Phosphat freisetzt. In Futtermitteln beträgt der Anteil an Phytat gebundenem Phosphat, je nach Zusammensetzung, zwischen ca. 60 - 80 %, was die Bedeutung und Notwendigkeit der effizienten Phosphatmobilisierung unterstreicht (Eeckhout W., 1994).

Eine der aktivsten Phytasen ist AppA aus *E. coli*. Für diese wurden spezifische Aktivitäten zwischen 800 - 8000 U/mg ermittelt (Golovan *et al.*, 2000; Greiner *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2003). Die *Klebsiella*-Phytase (PhyK) besitzt eine spezifische Aktivität von ca. 380 U/mg und reiht sich damit hinter den AppA-ähnlichen Phytasen ein. Die PhyK zeigt aber eine deutlich höhere spezifische Aktivität als die in der Tierhaltung verwendeten Pilzphytasen (ca. 100 U/mg) (Wyss *et al.*, 1999a). Die Phytase aus *Aspergillus niger* (Natuphos (BASF)) wird beispielsweise dennoch, hauptsächlich wegen der höheren Thermostabilität und trotz ihrer geringen Aktivität, verwendet.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugte *Klebsiella*-Phytasemutante PM22 könnte durchaus einen interessanten Kandidaten für eine kommerzielle Nutzung darstellen. Insbesondere die erhöhte spezifische Aktivität, der schnelle Abbau von Inositolphosphaten und die vermutlich verringerte Substrathemmung von PM22, wären für den Abbau des Phytats von Vorteil. Außerdem besitzt die PhyK, ähnlich der *E. coli*-Phytase, ein pH-Optimum im sauren Milieu. Damit ist die Wirkung der Phytasen auf den Magen und teilweise auf den Zwölffingerdarmbereich beschränkt. Sowohl die native PhyK als auch die aktiveren Phytasemutanten setzen bei saurem pH-Wert kontinuierlich Phosphat aus dem Phytat frei. Die Phytatkonzentration sinkt zwar langsam ab, es werden aber schnell niedrige InsPs, wie InsP3 und InsP2 gebildet. Damit unterscheidet sich PhyK von der AppA aus

E. coli, die im sauren pH sehr schnell Phytat über InsP5 zu InsP4 und InsP3 abbaut. Allerdings nimmt die Phosphatfreisetzungsrates danach deutlich ab. Trotzdem zeigten beide Enzyme nach ca. 120 min Reaktionszeit gleiche Phosphatbilanzen. Die Magenpassage des Futters ist aber nur auf maximal 60 min begrenzt. Es ist also enorm wichtig, möglichst schnell viel Phosphat innerhalb dieser kurzen Zeit zu mobilisieren und dabei möglichst einen vollständigen Phytatabbau zu erzielen, um die Folgen der Anreicherung von Inositolphosphaten zu verhindern.

Ein Einsatz der *Klebsiella*-Phytase in Kombination mit der *E. coli*-Phytase wäre ebenfalls denkbar. Wie hier gezeigt werden konnte, erfolgte die Phosphatfreisetzung dann gleichmäßig, obwohl die Geschwindigkeit geringer war als bei dem AppA-Abbau. Durch die Kombination beider Enzyme konnten aber die AppA-Abbauprodukte (InsP4 und InsP3) durch die PhyK schneller weiter bis zum Ins(2)P hydrolysiert werden. Damit konnte die Gesamtphosphatfreisetzung zwar verbessert, aber die Freisetzungsgeschwindigkeit nicht signifikant erhöht werden. Eine zeitversetzte Anwendung („coating“) dieser Phytasen könnte eine noch effizientere Wirkung zur Folge haben, was die Abbauanalysen der AppA-Produkte zeigten. Entsprechende Fütterungsversuche, in denen die Kombinationswirkung der Phytasen und der Einfluss der Enzymmengen untersucht werden sollen, sind bereits in Vorbereitung. Weiterhin können auch Effekte bei der Phytatverwertung, die beispielsweise durch die Pepsinwirkung oder von anderen Mikroorganismen ausgehen, untersucht werden.

3.1.6. Modell des Reaktionsmechanismus

Die Existenz einer offenen und geschlossenen Konformation und das geringfügig größere aktive Zentrum in der *E.coli*-Phytase deutet auf folgenden Reaktionsmechanismus hin: I) das Phytat wird zunächst in der offenen Konformation im aktiven Zentrum gebunden und induziert die geschlossene Konformation II) nun erfolgt die erste Hydrolyse in der geschlossenen Konformation; III) anschließend geht das Enzym wieder in die offene Konformation über, wobei das InsP5 vermutlich das Enzym verlässt bzw. in der Bindungstasche verbleibt und gedreht wird; IV) nun kann das InsP5 oder Phytat wieder an das Enzym in der offenen Konformation binden und der Zyklus beginnt erneut. Dieses Modell wird auch durch die HPIC-Analysen der Abbauprodukte gestützt (Greiner *et al.*, 2001b). In den hier durchgeführten Analysen konnte ebenfalls eine Anreicherung der AppA-generierten Zwischenabbauprodukte, wie InsP4, gezeigt werden.

Die Kristallstruktur der aktiven *Klebsiella*-Phytase zeigte auch ohne Anwesenheit von Phytat stets eine geschlossene Konformation. Somit wäre für die *Klebsiella*-Phytase ein Mechanismus denkbar, bei dem das Substrat im Phytasemolekül nach jeder Phosphathydrolyse verbleibt und rotiert. Trotz des vergleichsweise kleineren aktiven

Zentrums bietet es genug Raum für den „rotierenden“ Mechanismus. Der hier gezeigte kontinuierliche Abbau des Phytats würde diesen Reaktionsmechanismus untermauern. Die Größe des aktiven Zentrums und die fehlende Flexibilität der *Klebsiella*-Phytase behindern die effiziente Substratbindung und führen deshalb zu einer geringeren spezifischen Aktivität. Ist das Substrat einmal gebunden, könnte es in der Bindungstasche verbleiben und würde vollständiger hydrolysiert werden.

3.2. Die Glukose-1-Phosphatase AgpE aus *Enterobacter*

3.2.1. Biochemische Eigenschaften der AgpE

Die beiden Glukose-1-Phosphatasen aus *Enterobacter* und *E. coli* zeigten trotz der großen strukturellen Ähnlichkeiten einige Unterschiede in den biochemischen Eigenschaften (Cottrill *et al.*, 2002). Für beide Enzyme wurde eine molekulare Masse von ca. 44 kDa ermittelt, wobei eine pH-abhängige Polymerbildung der AgpE verzeichnet werden konnte. Mit fallendem pH-Wert erfolgte dabei eine verstärkte Assemblierung von AgpE-Monomeren. Es wurden molekulare Massen von ca. 153 kDa ermittelt, was auf die Bildung von tetrameren Formen hindeutete. Bei pH 7,5 erfolgt ausschließlich eine Zusammenlagerung der AgpE-Moleküle zu Homodimere. Für die Agp aus *E. coli* wurde zwar eine Dimerbildung beschrieben (Pradel & Boquet, 1988), allerdings konnten höhere Polymere nicht gezeigt werden. Deshalb stellte sich hier die Frage, inwiefern die Polymerisierung die biochemischen Eigenschaften beeinflusst.

Die AgpE besitzt, ebenso wie die Agp, ein breites Substratspektrum. Dabei werden Substrate, wie G1P, G6P, F1P, F6P, Phytat und pNPP hydrolysiert. Eine optimale Hydrolyse der Substrate G1P, Phytat und pNPP erfolgte durch die Agp in sauren pH-Bereichen bei pH 6,0, 4,5 und 3,5 (Cottrill *et al.*, 2002). Bei der AgpE lagen die pH-Optima für diese Substrate bei 4,5, 5,0 und 4,0. Damit unterscheiden sich die pH-Optima für Glukose-1-Phosphat um zwei pH-Einheiten und für Phytat und pNPP um 0,5 pH-Einheiten. Die Temperaturoptima für die Hydrolyse des Phytats und des Glukose-1-Phosphates unterschieden sich ebenfalls. Die Agp spaltet den Phosphatrest des Phytats bei 60 °C, dagegen erreichte die AgpE das Optimum bereits bei 50 °C. Die Optima für die G1P-Hydrolyse waren mit 55 °C gleich (Cottrill *et al.*, 2002). In Tabelle 13 sind die kinetischen Parameter im Vergleich dargestellt. Die AgpE zeigte mit 32 U/mg eine etwas höhere spezifische Phytaseaktivität als die Agp (16 U/mg). Die ermittelten *K_m*-Werte der AgpE waren für G6P, F1P und F6P niedriger als die der *E. coli* Agp, was auf höhere Enzymaffinitäten zu diesen Substraten schließen lässt. Die ermittelten spezifischen Aktivitäten für diese Substrate waren ebenfalls geringfügig höher. Die *K_m*-Werte und auch die spezifischen Aktivitäten für G1P und pNPP unterschieden sich nicht wesentlich.

Die Thermostabilität (45 °C) der Phosphatase war niedriger im Vergleich zu den Thermostabilitäten anderer unglykosylierter saurer Histidinphosphatasen, die bis 55 - 60 °C termisch stabil sind (Greiner *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2003; Sajidan *et al.*, 2004). Auch hier könnte der C-terminale Poly-His-Tag eine verringerte Thermostabilität bewirken.

Die pH-Stabilitäten der AgpE waren mit denen der *E. coli* Agp vergleichbar. Unter pH 3 sank die Aktivität deutlich ab. Hingegen sind beide Enzyme bis zu einem pH von 9 stabil. Erst über pH 10 sinkt die Aktivität der AgpE auf 40 % und damit deutlich ab, was bei der Agp aus *E. coli* nicht zu verzeichnen war (Cottrill *et al.*, 2002).

Tabelle 13: Vergleich der kinetischen Parameter für verschiedene Substrate der AgpE aus *Enterobacter cloacae* mit der Agp aus *E. coli*. Die Werte der Agp wurden von Cottrill übernommen (Cottrill *et al.*, 2002).

Substrate	Km (mM)		spezif. Akt. (U/mg)		kcat (s ⁻¹)		kcat/Km (s ⁻¹ * mM ⁻¹)	
	AgpE	Agp	AgpE	Agp	AgpE	Agp	AgpE	Agp
Glukose-1 Phosphat	0,31	0,39	196	160	145	117	464	300
Glukose-6 Phosphat	0,47	1,6	146	110	109	81	230	51
Fruktose-1 Phosphat	0,62	2,2	149	130	111	95	179	43
Fruktose-6 Phosphat	0,66	4,3	142	79	105	58	160	13
Phytat	0,51	0,54	32	16	24	12	47	22
pNPP	12,54	13	40	51	30	37	2	3

Die Aktivität der AgpE gegenüber den einzelnen Substraten wurde unterschiedlich stark durch Kationen beeinflusst. Die Komplexbildung von Phytat mit Kationen wie Fe²⁺, Cu²⁺ und Zn²⁺ verringerte deutlich die Phytaseaktivität. Die Bildung von unlöslichen Phytatkomplexen führt zu einer verminderten Verfügbarkeit des Substrates für das Enzym, was auch schon für andere saure Histidinphosphatasen beschrieben wurde (Konietzny & Greiner, 2002). Damit bevorzugt die AgpE eine metallfreie Form des Phytats (Phytinsäure). Dies wurde auch durch Zugabe des Chelatbildners EDTA deutlich. Hierbei wurden zweiwertige Kationen dem Reaktionsansatz entzogen, wodurch sich die Phytaseaktivität erhöhte. Eine starke inhibitorische Wirkung übten Al³⁺-Ionen auf die AgpE aus, das zum Verlust beider Aktivitäten, der Phytase- und Glukose-1-Phosphataseaktivität, führte. Andere Kationen hatten vorrangig einen negativen Effekt auf die Phytaseaktivität. Reduzierende Agenzien, wie 2-Mercaptoethanol, DTT und TCEP zeigten bei den verwendeten Konzentrationen nur leichte Effekte, was darauf hindeutet, dass die Ausbildung von Disulfidbrücken keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität hat. Hingegen waren stärkere inhibitorische Effekte bei geringen Detergenzienkonzentrationen nachweisbar. Die Detergenzien könnten die Auflösung von Sekundärstrukturen bewirken und die Polymerbildung beeinflussen, wodurch eine mögliche „Halbseitenreaktivität“ unterbunden wird und beide Aktivitäten stark absinken.

Der geringe Einfluss organischer Lösungsmittel auf beide Aktivitäten der AgpE, lässt sich gut durch die polar geladene Oberfläche und die polaren AS-Reste, welche für die enzymatische Reaktion verantwortlich sind, erklären. Dies zeigt vor allem, dass keine hydrophoben Reste in die Katalyse involviert sind. Ein ähnliches Verhalten wurde für die *Aspergillus niger*-Phytase beschrieben (Vats & Banerjee, 2005).

3.2.2. Struktureller Vergleich mit den *E. coli*-Enzymen Agp und AppA

Aus der strukturellen und der biochemischen Charakterisierung der AgpE geht eine hohe Ähnlichkeit zur Agp aus *E. coli* hervor, dass auch die hohe Aminosäure-Sequenzidentität von 79 % verdeutlicht. Die AgpE weist zudem eine Sequenzidentität von 31 % zu der Phytase aus *E. coli* (AppA) auf.

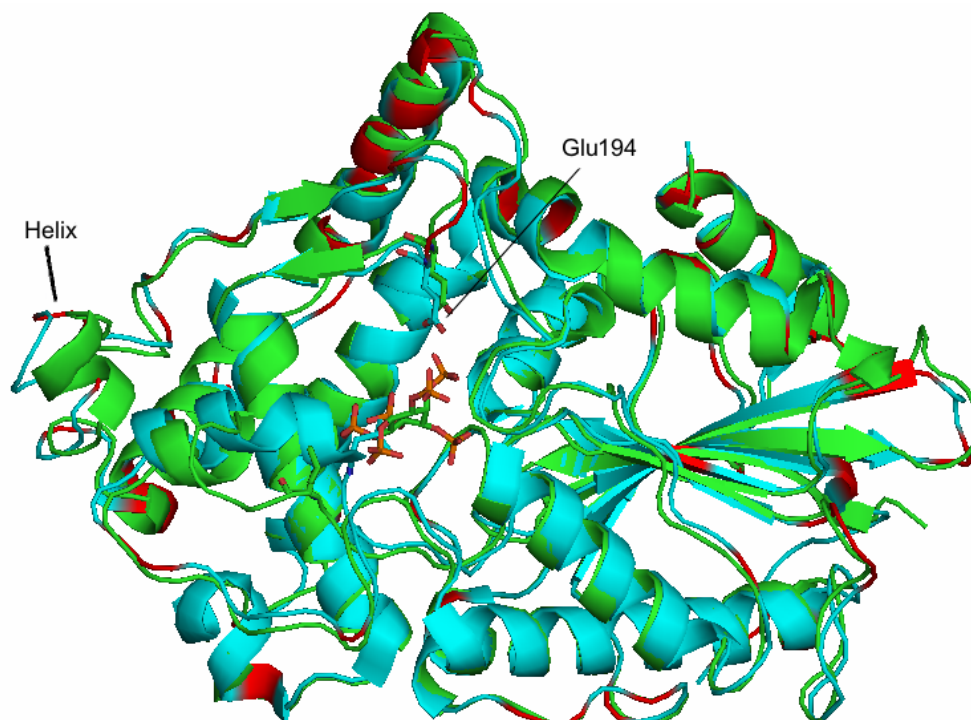


Abbildung 57: Überlagerung der Kristallstruktur der AgpE in der offenen Konformation (grün) mit der Kristallstruktur der Agp aus *E. coli* (blau). Bereiche mit unterschiedlichen Aminosäuren sind rot gekennzeichnet und befinden sich in den Randregionen der α - und α/β -Domänen. Die zusätzliche kleine α -Helix (Helix) der Agp und der für die Phytatbindung wichtige Glu194 bzw. Glu196 sind gekennzeichnet.

Der strukturelle Vergleich der AgpE (Dali Servers DaliLite v.3, Institute of Biotechnology, University of Helsinki) mit anderen bekannten Strukturen, die in der PDB Datenbank zugänglich sind, zeigte erwartungsgemäß die größte Ähnlichkeit zur Agp aus *E. coli*. Dabei wurde ein Z-Score von 64,8 – 64,2 bei 81 - 82 % Identität ermittelt. Die *E. coli*-Phytase stellt den nächsten strukturell ähnlichen Vertreter aus der Gruppe der

Histidinphosphatasen dar. Der Vergleich ergab einen errechneten Z-Score von 49,5 bis 48,5 und eine Identität von 32 %.

Die Strukturen der beiden Agp's sind in Bereichen der konservierten α/β - und α -Domänen, den Positionen der drei Disulfidbrücken und im aktiven Zentrum sehr homolog. In den äußeren Regionen sind die Aminosäureaustausche lokalisiert (Abbildung 57). Diese bewirken nur geringe strukturelle Unterschiede, die sich in der Ausbildung einer zusätzlichen kleineren Helix in der AgpE äußern (Abbildung 57).

Um die Auswirkungen der geringen strukturellen Abweichungen auf das aktive Zentrum zu untersuchen, wurde die Kristallstruktur der AgpE gelöst, wobei die Kristallisation der inaktiven AgpE mit Phytat erfolgte. Dabei wurden in einer asymmetrischen kristallographischen Einheit zwei Moleküle mit je einer offenen und einer geschlossenen Konformation sichtbar. Die beschriebene Konformationsänderung wird anscheinend durch die Bindung von Phytat induziert.

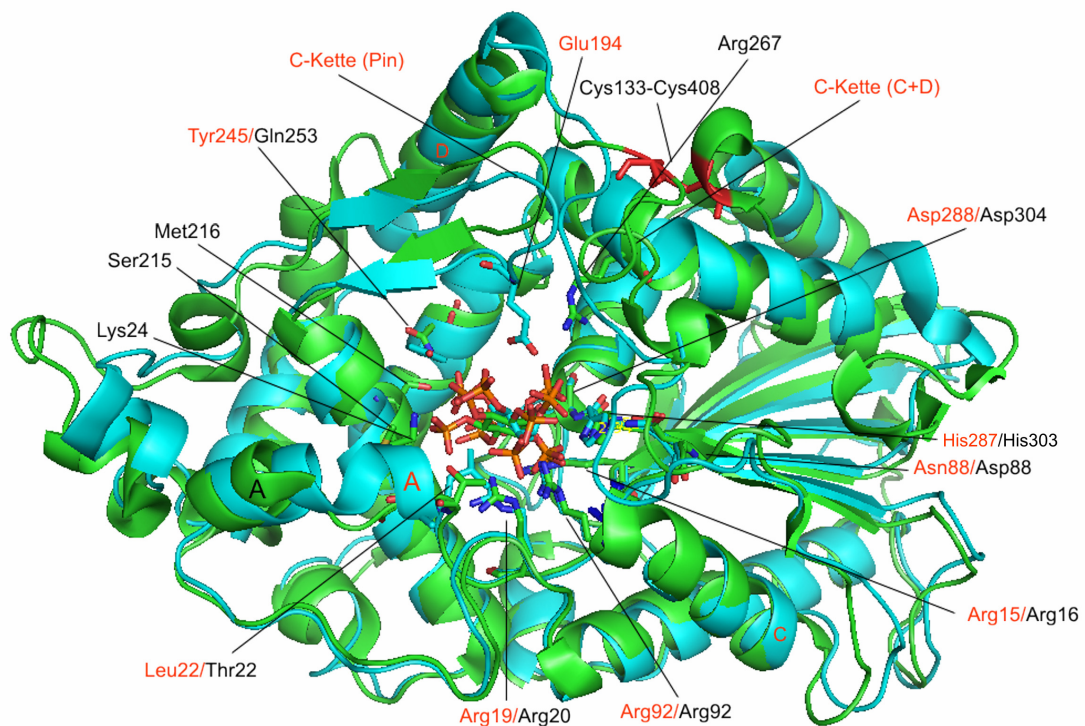


Abbildung 58: Überlagerung der Kristallstrukturen der AgpE (blau) und AppA (grün) in den geschlossenen Konformationen. Die wichtigen AS-Reste und Abweichungen der C^α-Kette (C-Kette (Pin), C-Kette (C+D)) der AgpE-Struktur sind rot gekennzeichnet. Die bedeutenden AS-Reste der Phytatbindung sowie die zusätzliche Disulfidbrücke (dunkelrot) der AppA sind schwarz gekennzeichnet. Zentral befinden sich die Phytatmoleküle mit den 3-Phosphatresten im aktiven Zentrum.

Die Kristallstruktur der Agp aus *E. coli* mit gebundenen G1P zeigte hingegen nur die geschlossene Konformation (Lee *et al.*, 2003). Eine Kristallisation mit Phytat war bei der Agp nicht erfolgreich, so dass sich das errechnete Phytatbindungsmodell nur auf

theoretische Annahmen stützt. In diesem Modell wird dem Glu196 (AgpE: Glu194) eine wesentliche Rolle für die Phytatbindung zugeschrieben (Lee *et al.*, 2003).

Strukturell unterscheidet sich die AgpE nicht stark von der Phytase aus *E. coli* (AppA). Lediglich einige Loopbereiche in den Randregionen (Abbildung 58) sowie die weitere Disulfidbrücke unterscheiden die beiden Enzyme. Zusätzlich sind Abweichungen von 5 – 7 Å zwischen den beiden C^α-Ketten im Bereich der α-Helices C und α-Helices D und im Loop zwischen den β-Faltblättern des β-Pins erkennbar (Abbildung 58, C-Kette (Pin) (C+D)). Inwieweit diese Abweichungen von Bedeutung für die Phytatbindung und den Abbau sind, kann nur vermutet werden. Wahrscheinlich ist durch den veränderten Verlauf der C^α-Kette das aktive Zentrum der AgpE kleiner, und einige Reste, wie Glu194, rücken näher in die Bindungstasche. Die Phytase aus *E. coli* zeigte ebenfalls eine induzierte Konformationsänderung durch die Bindung von Phytat (Lim *et al.*, 2000). Die Positionsänderungen einzelner Aminosäuren waren dabei nicht so stark ausgeprägt, wie bei dem Übergang der AgpE in die offene oder geschlossene Konformation. Die Positionsänderungen der AS-Reste Leu22, Ala23, Asn24, Asn25 und Gly26 bewirkten bei der Bildung der geschlossenen Konformation eine Verlängerung der Helix A. Hierbei konnte eine Positionsänderung von 4 - 10 Å gemessen werden. Die Kristallstrukturen der AppA zeigten, wie schon beschrieben, bei den Resten Thr23 und Lys24 eine Verschiebung von nur 4 - 5 Å.

3.2.3. Phytatbindung und Hydrolyse

In dem aktiven Zentrum der inaktiven AgpE-Mutante (His16Ala) konnte die Position des Phytats durch drei Elektronendichten, die den Phosphatresten P1, P3 und P4 entsprachen, nachgewiesen und modelliert werden. Zusätzlich waren Sekundärelektronendichten des P2-Restes erkennbar. Die Elektronendichte des *myo*-Inositols war nicht sichtbar, was, wie schon bei der Kristallstruktur der *Klebsiella*-Phytase, auf eine flexible Bindung oder auf mehrere mögliche Phytatbindungsstellen mit verschiedenen Orientierungen des Phytats hindeutet.

Bei der Bindung des Phytats wurde ein H-Brückennetzwerk unter Beteiligung der AS-Reste Tyr245 und des Glu194 ausgebildet (Abbildung 43). In der Kristallstruktur der inaktiven AgpE mit dem Inhibitor Inositolhexasulfat konnte eine ähnliche flexible Bindung unter Ausbildung der gleichen H-Brücken gezeigt werden. Allerdings waren hier vier Elektronendichten der Sulfatreste S2, S3, S4 und S5 sichtbar, wobei die Elektronendichte des 3-Sulfatrestes wie bei der Phytatbindung sehr gut definiert war. Die Elektronendichte des Inositolrings war auch hierbei nicht vollständig identifizierbar, aber ansatzweise erkennbar. Dies lag teilweise an der höheren Auflösung der Struktur, könnte aber auch durch eine stärkere Bindung des Inhibitors verursacht worden sein. Dafür würde auch die

Tatsache sprechen, dass hier andere Reste (Sulfat) als beim Phytat (Phosphat) fixiert werden. Inwiefern dies mit der Mutation His16Ala zusammenhängt, ist nicht klar. Es ist auch denkbar, dass die Sulfatreste des Inositolhexasulfates anders als die Phosphatreste des Phytats gebunden werden und so die Bindungstasche blockieren. Dies führt dann zur Inhibierung des Enzyms.

Interessanterweise war die erfolgreiche Kristallisation der AgpE abhängig vom Phytat. So dass hier die Phytatbindung und damit die induzierte Konformationsänderungen für die Kristallbildung mit verantwortlich waren. Um einen negativen Einfluss der His16Ala-Substitution auf die Phytatbindung der inaktiven AgpE-Mutante auszuschließen, wurden ITC-Messungen durchgeführt. Hierbei wurde eine hohe Affinität der Mutante zum Phytat bestimmt. In dem inaktiven Enzym könnte das Phytat allerdings wegen der Substitution durchaus eine leicht veränderte Bindungsposition besitzen.

In den ITC-Messungen wurde auch das molare Verhältnis von AgpE zum Substrat in Form des Faktors N bestimmt. Für G1P wurde ein Faktor von ca. $N = 1$ ermittelt, d.h. fast jedes AgpE-Molekül bindet ein G1P-Molekül. Im Unterschied dazu wurde für Phytat ein Faktor $N = 0,5$ ermittelt. Das bedeutet, zwei AgpE-Moleküle binden nur ein Phytatmolekül. Dieser Befund könnte auf eine „Halbseitenreaktivität“ hindeuten. Unter Berücksichtigung der gezeigten Dimerbildung der AgpE, könnte ein Molekül des Dimers durch Substratbindung die Affinität des zweiten beeinflussen. Die Kontaktregion der Moleküle war relativ groß, so dass über diesen Bereich eine Konformationsänderung induziert werden könnte. Dies würde das gleichzeitige Vorliegen einer offenen und einer geschlossenen Konformation in einem AgpE-Dimer erklären. Dagegen spricht allerdings der Befund, dass die vier AgpE-Moleküle, bei gleicher Bindung des Inhibitors Inositolhexasulfat, ausschließlich in der geschlossenen Konformation vorlagen. Eventuell verhindert der gebundene Inhibitor den Übergang in die offene Konformation. Für die Analyse der inhibitorischen Wirkung des Inositolhexasulfats wären weitere Untersuchungen nötig. Weiterhin würden gezielte AS-Substitutionen, der für die Dimerbildung verantwortlichen AS-Reste, für die Klärung und Bedeutung der Polymerbildung auf die Aktivität sehr hilfreich sein.

3.2.3.1. Vergleich der Phytatbindungen der AgpE und der AppA

Das kleinere aktive Zentrum der AgpE ist zwar eher für die Bindung des Glukose-1-Phosphates ausgelegt, bietet aber ausreichend Raum für die Bindung des Phytats und ermöglicht vermutlich auch eine Drehung des Phytats im aktiven Zentrum. Wie bei den Phytasen wird das Phytat über ein Netzwerk von H-Brücken fixiert und positioniert. Dennoch erfolgt nur die Hydrolyse des 3-Phosphatrestes zu einem D-Ins(1,2,4,5,6)P5. Der 3-Phosphatrest wird vor allem durch die katalytisch bedeutenden AS-Reste, wie die Argininreste (Arg15, Arg19, Arg92), Asp288 und His287, in der geschlossenen

Konformation stark gebunden (Abbildung 58 und Abbildung 43). Gleichzeitig wird das Phytat über mindestens fünf weitere H-Brücken zu den Phosphatresten P1, P2, P4, P5 und P6 fixiert. Die katalytisch aktiven Histidinreste, His16 und His287, werden in der AgpE wie auch in anderen sauren Histidinphosphatasen ebenfalls durch H-Brücken positioniert. Vermutlich wird dies durch H-Brücken zum Asn17 und zum Asn88 bewerkstelligt. Bei den Phytasen erfolgt dies meist durch einen Glycinrest und einen Asparaginsäure- bzw. Serinrest (Lim *et al.*, 2000) (2.2.2). Die Bindung des 3-Phosphatrestes erfolgt im Wesentlichen wie in den Phytasen (Abbildung 58). Für die Bindung des axialen 2-Phosphatrestes ist hier der Glu194-Rest verantwortlich. Dieser ist für die Glukose-1-Phosphatase spezifisch und nicht in der AppA-Struktur vorhanden. Die Fixierung des 2-Phosphatrestes erfolgt in der AppA vor allem mittels des Lys267-Restes. Der Tyr245 der AgpE befindet sich in gleicher Position wie der Gln253 der AppA und fixiert ebenfalls den 5-Phosphatrest des Phytats. Eine Besonderheit in der Phytatbindung der AppA ist die Bindung des 6-Phosphatrestes durch den Lys24 (Abbildung 58-Lys24). Dieser Rest ist nur bei AppA-ähnlichen Enzymen, wie die Phytase aus *Citrobacter*, zu finden (7.2). Im Vergleich zur AppA scheint das Phytat in der AgpE, ähnlich wie bei der *Klebsiella*-Phytase, weniger stark fixiert zu werden. Die Aktivitätsunterschiede zwischen den Phytasen und der AgpE werden somit hauptsächlich durch die unterschiedlich starken Bindungen und möglichen Bindungspositionen des Phytats bestimmt. Zusätzlich könnte das Phytatabbauprodukt InsP5 nicht für einen weiteren Hydrolyseschritt positioniert werden, was bei den Phytasen sehr effizient erfolgt. Demnach spielen die wenigen erkennbaren strukturellen Unterschiede der AgpE zur AppA doch eine entscheidende Rolle. Offensichtlich bewirken der geringfügig veränderte Verlauf der C α -Kette in Kombination mit Aminosäureaustauschen, eine veränderte Bindung von Phytat und deren Abbauprodukten, wie InsP5.

3.2.4. Mutationsanalysen und der weitere Abbau des Phytats durch die AgpE-Mutanten

Mittels Mutationsanalysen konnten die Bedeutungen der beschriebenen H-Brücken für die Fixierung des Phytats besser verdeutlicht werden. Das Fehlen einer H-Brücke zum Tyr245 bewirkte bereits eine sehr starke Reduktion der Phytaseaktivität (PMG-V und PMG-X). In der Agp aus *E. coli* bildet dieser Tyr-Rest ebenfalls eine H-Brücke zum G1P aus (Lee *et al.*, 2003). Der Einbau von Gln245 bewirkte eine deutliche Erhöhung der Glukose-1-Phosphataseaktivität um ca. 100 U/mg. Durch die Substitution des Tyr245Gln wird wahrscheinlich das G1P besser fixiert.

Alle Agps besitzen direkt neben dem HD-Motiv einen Serinrest im aktiven Zentrum. Die Phytasen weisen dagegen an dieser Stelle einen Threoninrest auf. Somit lag die

Vermutung nahe, dass die geringe Phytaseaktivität der Agp's auf diesen Serinrest zurückzuführen sein könnte. Allerdings widerlegte die Mutation Ser289Thr (PMG-VII) diese Vermutung, denn dieser Austausch bewirkte sogar eine Reduktion der Phytaseaktivität bei gleicher Glukose-1-Phosphataseaktivität. Die Bedeutung des Serinrestes für die Glukose-1-Phosphataseaktivität ist damit unklar. Allerdings scheint dieser Rest für die Phytaseaktivität der AgpE wichtig zu sein.

Nach Lee sind das kleinere aktive Zentrum und die AS-Reste Leu24 und Glu196 für die geringere Phytaseaktivität der *E. coli* Agp im Vergleich AppA verantwortlich (Lee *et al.*, 2003). Beide AS-Reste (hier Leu22 und Glu194) sind in der Kristallstruktur der AgpE ebenfalls vorhanden (Abbildung 57). Der Leucinrest rückt beim Übergang von der offenen in die geschlossene Konformation deutlich in das aktive Zentrum und behindert damit den Zugang. In der offenen Konformation ist das aktive Zentrum nicht blockiert. Die Mutation Leu22Thr (PMG-I und PMG-II) bewirkte eine deutliche Reduktion beider Aktivitäten, was auf die Ladung des Threoninrestes oder die verkürzte Seitenkette zurückzuführen ist. Die ungeladene Seitenkette des Leucins schiebt vermutlich das Phytat in die richtige Position. Bei der Phytatbindung waren zwei H-Brücken zum Glu194 ersichtlich. Dieser Glu194-Rest scheint vor allem in der geschlossenen Konformation von Bedeutung zu sein, da so die Fixierung des axialen P2-Restes erfolgt.

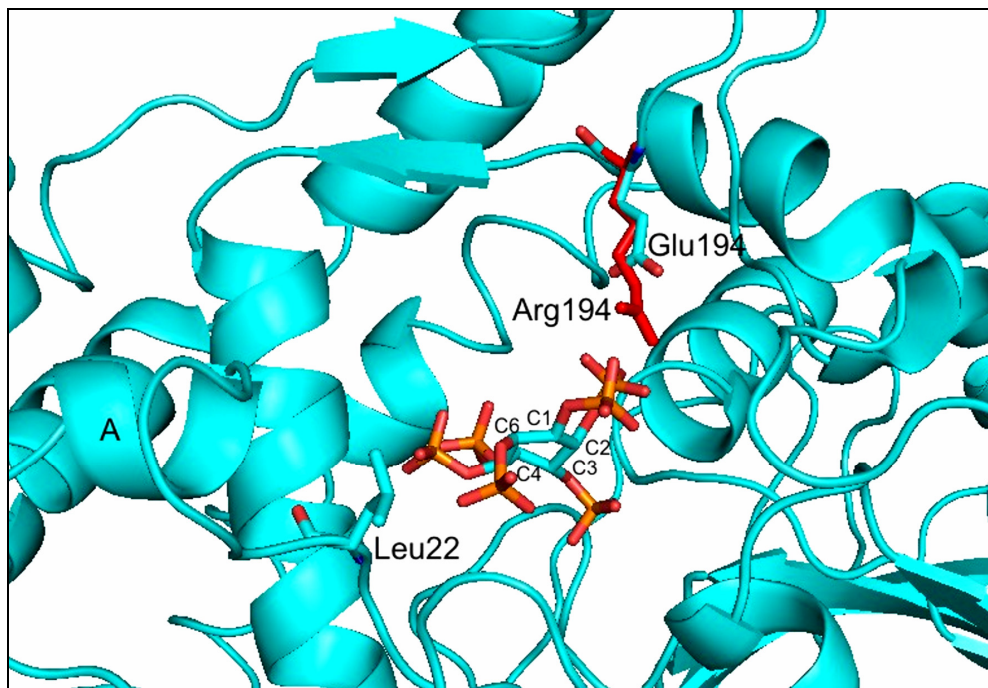


Abbildung 59: Die Lage des Glu194-Restes bzw. des Arg194-Restes in der offenen Konformation der inaktiven AgpE. Die Lage der Seitenkette des Arg194 ist hypothetisch. Die Argininseitenkette befindet sich deutlich näher am P2-Rest des Phytats.

Die Mutationen des Glu194 bewirkten dementsprechend eine Reduktion beider AgpE-Aktivitäten (PMG-IV und PMG-IX), da sie wahrscheinlich einen negativen Einfluss auf die Bindung des Phytats hatten. Überraschenderweise zeigte aber die Analyse der Phytatabbauprodukte, dass nach dem vollständigen Abbau des Phytats zu D-Ins(1,2,4,5,6)P5, ein weiterer Phosphatrest, der 4-Phosphatrest, abgespalten wurde und ein D-Ins(1,2,5,6)P4 entstand. Unter der Annahme, dass in der nativen AgpE das Zwischenprodukt InsP5 mit dem 4-Phosphat bindet, müssten sich der P2- oder 6-Phosphatrest deutlich weiter vom Glu194 entfernt befinden. Damit ist die Ausbildung einer H-Brücke unwahrscheinlich. Durch die nun fehlende Fixierung des entsprechenden Phosphatrestes kann keine stabile Bindung des Substrates und dementsprechend keine Abspaltung des 4-Phosphatrestes erfolgen.

Der Austausch zu Lysin (PMG-IV) oder Arginin, in Kombination mit einem Ser289Thr-Austausch (PMG-IX), könnten durch die längeren Seitenketten die notwendige H-Brückenbildung beispielsweise zum P2 oder P6 bewirken und damit die notwendige Fixierung des InsP5 bewerkstelligen (Abbildung 59). Die Seitenkette des Arginins kann verschiedene Konformationen annehmen und so unterschiedliche Wechselwirkungen über H-Brücken eingehen. Die Argininseitenkette muss jedoch eine andere Lage als die Glutaminseitenkette in der geschlossenen Konformation haben, da diese sonst direkt mit dem Substrat in Kontakt treten würde.

Die Substitution zum Arginin bewirkte sogar einen Abbau des InsP4 zu InsP3, wobei die isomere Form dieses Produktes nicht genau bestimmt werden konnte. Dies lässt vermuten, dass die Bindung des D-InsP5 den kritischen Schritt bei der Phytathydrolyse der AgpE darstellt. Die niedrigen Inositolphosphate könnten eventuell besser gebunden werden. Eine Analyse der Kristallstruktur der inaktiven Mutante PMG-IX könnte hier aufschlussreich sein. Damit würde die Lage und Wirkung des Arginins auf die Bindung von InsP5 besser verstanden werden. Eine Kristallisation dieser Mutante war jedoch bislang erfolglos. Des Weiteren könnten ITC-Analysen dieser Mutante und die sich daraus ergebenden Affinitätsänderungen gegenüber Phytat und D-Ins(1,2,4,5,6)P5 zu weiteren Rückschlüssen führen. Die beiden Mutationen bewirkten einen weiteren Abbau des Phytats und sind damit erste Grundlagen für weitere Mutationen, um das Substratspektrum der AgpE zu verändern.

Zusammenfassung

Die Glukose-1-Phosphatase aus *Enterobacter cloacae* (AgpE) baut neben G1P auch Phytat ab. In dieser Arbeit ist es gelungen, das Enzym mit gebundenen Phytat zu kristallisieren und die Struktur zu klären. Dabei bewirkte die Phytatbindung deutliche Konformationsänderungen. In dem AgpE-Dimer waren eine offene und geschlossene

Konformation sichtbar. Durch gezielte Mutagenese ist es gelungen, das Substratspektrum der AgpE zu verändern. Dabei war ein weiterer Abbau des Phytats, über D-Ins(1,2,4,5,6)P₅ hinaus bis zum InsP₃ zu beobachten.

4. Material

4.1. Primer und Oligonukleotide

Tabelle 14: Verwendete Primer und Oligos.

Name	Länge	Sequenz 5'-3'	Schnittstelle
KlebTH-fw	30	TCGGATCCGCCGCCGCCGCGCGACTGGCAGCTG	<i>Bam</i> HI
KlebTH-rv	30	CCGGCGGTAGCCATGGTCCTGCCGAAGCTT	<i>Hind</i> III
Oligo His fw	30	P-GATCTGGACACCACCACCACCACCACTGAG	-
Oligo His rv	30	P-TCGACTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGTCCA	-
Tom20phyKfw	35	AATAAGCTTCTGCAGACTGGCAGCTGGAGAAAGT G	<i>Hind</i> III
Tom21phyKrv	29	TTTAGATCTCGGCAGGACCATGGCTACCG	<i>Bgl</i> II
Kleb (HtoA)fw	21	GCTTAGCCGCGCCGGCATTCCG	-
Kleb (HtoA)rv	21	CGAATGCCGCGCGCGCTAAGC	-
N-26	26	CATCATAACGGTTCTGGCAAATATTC	-
C-24	24	CTGTATCAGGCTGAAAATCTTCTC	-
appA fw	26	CAATAAGCTTTCGCTCAGAGTGAGCC	<i>Hind</i> III
appA rv	27	TTAAGATCTGCACGCCGGTATGCGTGC	<i>Bgl</i> II
OB_for1	28	AGTGAGGAATTACATATGAGAAAAGCAC	<i>Nde</i> I
OB_rv	24	TGAATTCGCCGCGTTATTCATCAC	<i>Eco</i> RI
THG1Pintern1	20	CCGCGCAGTTCTTCATCACC	-
THG1Pintern2	21	CGTTCACGCTGCAGTATTACG	-
G1PHindIII fw	28	GCGCAAGCTTCGCCGGAAGGGTATCAGC	<i>Hind</i> III
G1P BglII rv	29	CCGCAGATCTCTTCGCCGCGTTATTCATC	<i>Bgl</i> II
G1P-Mut (HtoA)fw	23	ATGAGCCGTGCCAACCTGCGCGC	-
G1P-Mut (HtoA) rv	23	GCGCGCGCAGGTTGGCACGGCTC	-
Tom10	29	TCATGAATTCATGCCTGCAAGACATCAGG	<i>Eco</i> RI
Tom11	31	GTAGGATCCCTACGGCAGGACCATGGCTACC	<i>Bam</i> HI
KM-1	25	TAGAATTCAAGGAACAGTGAATTGG	-
KM-2	28	AGATGTCTAAAAAGCTTGTAGTTAAACC	-
appA1	60	TTGAAAGCGATCTTAATCCCATTTTTATCTCTTCT GATTCTTCAAGGAACAGTGAATTGG	-
appA2	60	CAAACCTGCACGCCGGTATGCGTGCTTCATTCACG ATTTGCAAAAAGCTTGTAGTTAAACC	-

Die weiteren verwendeten Mutationsprimer der RP-, PM-, PMG-Mutagenesen sind im Anhang aufgelistet.

4.2. Plasmide

Tabelle 15: Ausgangsplasmide für die Klonierungen

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
pET22b(+)	<i>Amp^r, lacI</i>	Novagen
pUC19	<i>Amp^r</i>	Fermentas
pFlag-CTS	<i>Amp^r, lacI</i>	Sigma-Aldrich
pFlag-CTS-His	<i>Amp^r, lacI</i>	in dieser Arbeit
pBS-TEF-PHO5	<i>Amp^r</i>	Wartmann <i>et al.</i> , 2003

Die Expressionsplasmide sind in Tabelle 17 benannt und die Erzeugung ist nachfolgend unter Konstruktion von Plasmiden beschrieben. Die Plasmidkarten befinden sich im Anhang.

4.3. Stämme

Tabelle 16: Ausgangsstämme

<i>E. coli</i>	Genotyp	Referenz
DH5α	<i>supE hsdR17 recA1</i> <i>ΔlacU169(Ø80/lacZΔM15)</i> <i>gyrA96 thi-1 endA1</i>	(Sambrook, 1989)
XL1 Blue	Tetr <i>Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZΔM15</i> <i>Tn10 (Tet^r) Tn5 (Kan^r) amy]</i>	Stratagene
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Novagen
BL21phoB::Tn10	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) <i>phoB</i>	Eucodis GmbH
C41 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Novagen
BL21-1T	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3), <i>appA::aphA3 (Kan^r)</i>	in dieser Arbeit
B834 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm met</i> (DE3)	Novagen
<i>Arxula adenivorans</i> LS3		
G1211	<i>aleu2</i>	(Wartmann <i>et al.</i> , 2003)
Wildtypstämme		
<i>Klebsiella</i> sp. (ASR1)	Wildtyp	(Sajidan <i>et al.</i> , 2004)
<i>Enterobacter cloacae</i> (ASR5)	Wildtyp	(Sajidan <i>et al.</i> , 2004)
<i>Escherischia Coli</i> K12	Wildtyp	(Blattner <i>et al.</i> , 1997)

Tabelle 17: Expressionsstämme

Wirtstamm	Plasmid	GVO	Referenz
BL21phoB::Tn10	pFlag-CTS-K1	BL21phoB-pFlag-CTS-K1	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-K1	BL21phoB-pFlag-His-K1	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP1-25	BL21phoB-pFlag-His-RP1-25	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP1-65	BL21phoB-pFlag-His-RP1-65	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP2-21	BL21phoB-pFlag-His-RP2-21	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP2-36	BL21phoB-pFlag-His-RP2-36	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP2-45	BL21phoB-pFlag-His-RP2-45	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP3-2	BL21phoB-pFlag-His-RP3-2	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP3-4	BL21phoB-pFlag-His-RP3-4	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP3-7	BL21phoB-pFlag-His-RP3-7	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP3-19	BL21phoB-pFlag-His-RP3-19	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP3-65	BL21phoB-pFlag-His-RP3-65	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP4-68	BL21phoB-pFlag-His-RP4-68	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP4-135	BL21phoB-pFlag-His-RP4-135	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP5-14	BL21phoB-pFlag-His-RP5-14	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP5-22	BL21phoB-pFlag-His-RP5-22	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP5-30	BL21phoB-pFlag-His-RP5-30	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP5-38	BL21phoB-pFlag-His-RP5-38	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP6-112	BL21phoB-pFlag-His-RP6-112	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP6-161	BL21phoB-pFlag-His-RP6-161	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP6-186	BL21phoB-pFlag-His-RP6-186	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP7-65	BL21phoB-pFlag-His-RP7-65	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP7-67	BL21phoB-pFlag-His-RP7-67	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP7-107	BL21phoB-pFlag-His-RP7-107	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP8-31	BL21phoB-pFlag-His-RP8-31	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP8-40	BL21phoB-pFlag-His-RP8-40	in dieser Arbeit

BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP8-91	BL21phoB-pFlag-His-RP8-91	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP9-5	BL21phoB-pFlag-His-RP9-5	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP9-31	BL21phoB-pFlag-His-RP9-31	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP9-52	BL21phoB-pFlag-His-RP9-52	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP10-1	BL21phoB-pFlag-His-RP10-1	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP10-54	BL21phoB-pFlag-His-RP10-54	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP10-66	BL21phoB-pFlag-His-RP10-66	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-RP10-74	BL21phoB-pFlag-His-RP10-74	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM1-3	BL21phoB-pFlag-His-PM1	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM2-6	BL21phoB-pFlag-His-PM2	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM2-5-3	BL21phoB-pFlag-His-PM2-PM5	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM2-6-2	BL21phoB-pFlag-His-PM2-PM6	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM3-2	BL21phoB-pFlag-His-PM3	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM3-5-3	BL21phoB-pFlag-His-PM3-PM5	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM3-6-2	BL21phoB-pFlag-His-PM3-PM6	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM4-2	BL21phoB-pFlag-His-PM4	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM4-6-3	BL21phoB-pFlag-His-PM4-PM6	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM5-1	BL21phoB-pFlag-His-PM5	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM6-3	BL21phoB-pFlag-His-PM6	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM7-1	BL21phoB-pFlag-His-PM7	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM8-1	BL21phoB-pFlag-His-PM8	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM9-5	BL21phoB-pFlag-His-PM9	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM11-2	BL21phoB-pFlag-His-PM11	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM12-1	BL21phoB-pFlag-His-PM12	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM13-2	BL21phoB-pFlag-His-PM13	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM14-1	BL21phoB-pFlag-His-PM14	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM15-1	BL21phoB-pFlag-His-PM15	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM16-1	BL21phoB-pFlag-His-PM16	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM17-1	BL21phoB-pFlag-His-PM17	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM18-1	BL21phoB-pFlag-His-PM18	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM19-1	BL21phoB-pFlag-His-PM19	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM20-1	BL21phoB-pFlag-His-PM20	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM21-1	BL21phoB-pFlag-His-PM21	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM22-2	BL21phoB-pFlag-His-PM22	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM23-2	BL21phoB-pFlag-His-PM23	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PM24-3	BL21phoB-pFlag-His-PM24	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-G1P-2	BL21phoB-pFlag-His-G1P	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-G1P-M1-1	BL21phoB-pFlag-His-G1P-M1	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PMG-I-2	BL21phoB-pFlag-His-PMG-I	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PMG-II-1	BL21phoB-pFlag-His-PMG-II	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PMG-IV-1	BL21phoB-pFlag-His-PMG-IV	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PMG-V-1	BL21phoB-pFlag-His-PMG-V	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PMG-VI-2	BL21phoB-pFlag-His-PMG-VI	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PMG-VII-2	BL21phoB-pFlag-His-PMG-VII	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PMG-IX-1	BL21phoB-pFlag-His-PMG-IX	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PMG-X-1	BL21phoB-pFlag-His-PMG-X	in dieser Arbeit
BL21-1T	pFlag-His-PMG-IX	BL21-1T-pFlag-His-PMG-IX	In dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PMG-XI-3	BL21phoB-pFlag-His-PMG-XI	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PMG-XII-1	BL21phoB-pFlag-His-PMG-XII	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-PMG-XIII-1	BL21phoB-pFlag-His-PMG-XIII	in dieser Arbeit
BL21phoB::Tn10	pFlag-His-AppA-1	BL21phoB-pFlag-His-AppA	in dieser Arbeit
BL21 (DE3)	pET-1TK	BL21-1TK	in dieser Arbeit
C41 (DE3)	pET-1TK	C41-1TK	in dieser Arbeit
C41 (DE3)	pET-1TK-M1	C41-1TK-M1	in dieser Arbeit
C41 (DE3)	pET-G1P	C41-1TG1P	in dieser Arbeit
C43 (DE3)	pET-1TK	C43-1TK	in dieser Arbeit
B834 (DE3)	pET-1TK	B834-1TK	in dieser Arbeit
<i>Arxula</i> (G1211)	pBS-TH-Kp-1/3/4	p9 und p12	in dieser Arbeit, Hahn <i>et al</i> 2006

Die Ausgangsplasmide und pET-Expressionsplasmide wurden vor der Transformation in die Expressionsstämme in DH5α transformiert und die mutagenisierten Plasmide pET-1TK-M1 und pFlag-His-G1P-M1 wurden in XL1 Blue transformiert.

4.4. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 18: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie oder Reagenzi	Hersteller
40% Acryl-Bisacrylamid-Lösung (29:1)	Roth
Agarose	Roth
Ammoniummetavanadate	Fluka
Ammoniummolybdate	Sigma-Aldrich
APS - Ammoniumpersulfat	Roth
Bis-Tris - Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan	Roth
Bradfordreagenz Roti Quant	Roth
BSA – Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich
CaCl ₂ - Kalziumchlorid	Roth
CaCO ₃ - Kalziumkarbonat	Merck
Chlorophorm-Isoamylalkohol (24:1)	Roth
Coomassie R250, G250	Roth
EDTA - Ethylendiamintetraessigsäure	Roth
Eisen(III)nitrat	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Roth
Formaldehyd 37%	Merck
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
HCl 37% (konz.)	Roth
Imidazol	Sigma-Aldrich
IPTG – Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	Roth
Isopropanol	Merck
Methanol	Roth
MgCl ₂ - Magnesiumchlorid	Roth
Milchpulver	Biorad
MOPS – 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure	Roth
NaCl - Natriumchlorid	Roth
NaOH-Pellets - Natriumhydroxid	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumdesoxycholat (DOC)	Roth
Natriumthiosulfat	Fluka
Perchlorsäure	Merck
Perjodsäure	Roth
PMSF - Phenylmethylsulfonylfluorid	Roth
Salpetersäure	Merck
Sarkosyllösung	Roth
SDS - Sodiumdodecylsulfat	Serva
Selenomethionin	Sigma
Silbernitrat	Roth
TCA - Trichloressigsäure	Fluka
TEMED - Tetramethylethylendiamin	Roth
TRIS – Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck
Tween20	Biorad
β-Mercaptoethanol	Merck

4.5. Puffer und Lösungen

Tabelle 19: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Puffer für DNA-Arbeiten	
1 x TE	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA pH 8,0
5 x Q-Solution	nach Qiagen
6 x DNA-Ladepuffer	30 % Glycerin, 10 mM EDTA (pH 8,0), 0,25 % Bromphenolblau
P1, P2; P3	nach Qiagen
Pfu-Puffer	200 mM Tris-HCl (pH 8,8), 100 mM KCl, 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM MgSO_4 , 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA
Taq-Puffer	160 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 670 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 % Tween20, 25 mM MgCl_2
Puffer für biochemische Arbeiten	
1 x TAE-Puffer	40 mM Tris, 1,1 ml/l Eisessig, 1 mM EDTA, 0,5 µg/l Ethidiumbromid
10 x TE	100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA pH 8,0
10x Anodenpuffer	nach Bio-Rad
10x Kathodenpuffer	nach Bio-Rad
10x TBST-Puffer	100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1,5 M NaCl, 0.5 % Tween20
10x Tris-Glycin-Laufpuffer (TG-Puffer)	250 mM Tris, 1,92 mM Glycin pH 8,8
5 x SDS-Ladepuffer	0,125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 20 % Glycerin, 4 % SDS, 1,4 M β -Mercaptoethanol, 1 Vol% Bromphenolblau
Antikörperlösung	1xTBST mit 4 % Magermilchpulver und spezif. Antikörper (1:1000-1:10000)
AP-Puffer	100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl_2
Block-Lösung	1xTBST, 5 % Magermilchpulver
Blot-Puffer	1 x TG-Puffer, 20 % Methanol
SDS-Laufpuffer	1 x TG-Puffer, 1 % SDS
Puffer für Proteinreinigungen	
His-Tag-FPLC-Bindepuffer	20 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol
His-Tag-FPLC-Elutionspuffer	20 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol
His-Tag-Waschpuffer A	20 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol
His-Tag-Waschpuffer B	20 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl, 50 mM Imidazol
His-Tag-Waschpuffer C	20 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl, 75 mM Imidazol
His-Tag-Elutionspuffer D	20 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl, 100 mM Imidazol
His-Tag-Elutionspuffer E	20 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl, 150 mM Imidazol
His-Tag-Elutionspuffer F	20 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl, 300 mM Imidazol

Weitere Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

4.6. Medien

Tabelle 20: Medienzusammensetzung

Medium	Zusammensetzung
LB	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,5
LB-Platten	wie LB-Medium mit 15 g/l Agar
R-Top-Agar	10 g/l Trypton, 1 g/l Hefeextrakt, 8 g/l NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 1 g/l Glukose, 8 g/l Agar
R-Platten	wie R-Top-Agar nur mit 15 g/l Agar
2xTBY	20 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,5
SOC-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,6 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , pH 6,8 – 7,0, 20 mM Glukose
NMM (New Minimal Medium) für SeMeth-Inkorporation	7,5 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 8,5 mM NaCl, 55 mM KH ₂ PO ₄ , 100 mM K ₂ HPO ₄ , 1 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose, 1 mg/l Ca ²⁺ und Fe ²⁺ , 1 µg/l Cu ²⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , MoO ₄ ²⁻ , 10 mg/l Biotin und Thiamin, 50 mg/l alle Aminosäure außer Methionin (Stocklösung 50 g/l Aminosäuren gelöst in 137 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,76 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,0)
NZY+	10 g/l Caseinhydrolysat, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 12,5 mM MgCl ₂ , 12,5 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose, pH 7,5
10 x P _i freies MOPS-Medium	83,72 g/l MOPS, 7,17 g/l Tricin, 1 mM FeSO ₄ ·7H ₂ O, 95 mM NH ₄ Cl, 2,76 mM K ₂ SO ₄ , 5 µM CaCl ₂ ·2H ₂ O, 5,25 mM MgCl ₂ , 0,5 M NaCl, 0,2 ml / l Mikromutrient-Lsg (0,18 mg/ml Ammoniummolybdat-Tetrahydrat, 1,24 mg/ml H ₃ BO ₃ , 0,12 mg/ml CuSO ₄ , 0,8 mg/ml MnCl ₂ , 0,14 mg/ml ZnSO ₄), pH 7,4
Phytatmedium	0,065-0,15 mM Na-Phytat (Dodec-Salz (Aldrich)), P _i freies 1xMOPS-Medium, 0,01 % Thiamin, 0,4 % D-Glukose, 20 µg/ml Ampicillin, 20 µg/ml Tetracyclin, 0,2 mM IPTG
YMM (Yeast Minimal Medium)	999 ml Komponente I (3,7 g/l NaNO ₃ , 8,4 g/l KH ₂ PO ₄ , 1 g/l MgSO ₄ ·7H ₂ O, 20 g/l Glukose, 1 g/l Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O, 10 mg/l FeCl ₃ ·6H ₂ O), 1 ml Komponente II (0,5 mg/ml H ₃ BO ₃ , 0,1 mg/ml CuSO ₄ ·5H ₂ O, 0,1 mg/ml KJ, 0,303 mg/ml MnSO ₄ ·H ₂ O, 0,4 mg/ml ZnSO ₄ ·7H ₂ O, 0,235 mg/ml Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O, 0,183 mg/ml CoCl ₂ ·6H ₂ O, steril filtriert, pH 7,0), Komponente I und II zusammen autoklavieren und 5 ml Vitamin-Mix (0,4 mg/ml Ca-D-Pantothenat, 0,4 mg/ml Thiamindichlorid, 0,1 mg/ml Nikotinsäure, 0,4 mg/ml Pyridoxin, 0,4 µg/ml Biotin, 4 mg/ml myo-Inositol, steril filtriert) zugeben, (20 mg/l Histidin, 20 mg/l Leucin, 20 mg/l Tryptophan)
YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose)	10 g/l (1 %) Hefeextrakt, 20 g/l (2 %) Pepton, 20 g/l (2 %) Dextrose

4.7. Antibiotika

Tabelle 21: Antibiotika und verwendete Konzentrationen

Antibiotika	Stocklösung	Endkonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 mg / ml	100 µg / ml	Roth
Tetracyclin	15 mg / ml	15 µg / ml	Roth
Kanamycin	20 mg / ml	20 µg / ml	Roth

4.8. Enzyme und andere Proteine

Tabelle 22: Restriktionsenzyme

Enzym	Konzentration	Hersteller
BamHI	10 U / µl	Fermentas
BglII	10 U / µl	Fermentas
EcoRI	10 U / µl	Fermentas
HindIII	10 U / µl	Fermentas

<i>SalI</i>	10 U / μ l	Fermentas
<i>Sau3A</i>	10 U / μ l	New England Biolabs

Tabelle 23: Weitere Enzyme

Enzym	Konzentration	Hersteller
Benzonase	10 U / ml	Novagen
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	1 U / μ l	Fermentas
<i>DpnI</i>	10 U / μ l	Fermentas
Lysozym	135000 U / mg	Serva
Pfu-DNA-Polymerase	2,5 U / μ l	Fermentas
Proteinase K	20 mg / ml TE	Qiagen
T4-DNA-Ligase	5 U / μ l	Fermentas
Taq-DNA-Polymerase	5 U / μ l	Bioron

Tabelle 24: Antikörper

Antigen	IgG	Konjugat	Hersteller
His-Tag	Kaninchen	kein	Santa Cruz
<i>Klebsiella</i> -Phytase	Kaninchen total Periplasma	kein	Dr. J. Pineda
Kaninchen IgG	Ziege	Alkalische Phosphatase (AP)	Sigma-Aldrich

4.9. Enzymsubstrate

Tabelle 25: Verwendete Enzymsubstrate

Substrat	verwendete Konzentration	Hersteller
Na-Phytat (Phytic acid dodecasodium salt hydrate)	0,1-5 mM im Reaktionspuffer für Phytasetests ; 0,01 mM im Phytatmedium	Aldrich (274321-100g)
Na-Phytat (Phytic acid sodium salt, From Corn)	5 mM Standard-Phytasetest	Sigma-Aldrich (P8810)
Glukose-1 Phosphat (α -D-Glucose 1-phosphate dipotassium salt hydrate)	5mM , 100mM Na-Acetat pH 5.0	Sigma-Aldrich (G-6750)
Glukose-6 Phosphat (D-Glucose 6-phosphate dipotassium salt hydrate)	5mM , 100mM Na-Acetat pH 5.0	Sigma-Aldrich (G-7375)
Fruktose-1 Phosphat (D-Fructose 1-phosphate sodium salt)	5mM , 100mM Na-Acetat pH 5.0	Sigma-Aldrich (F-1127)
Fruktose-6 Phosphat (D-Fructose 6-phosphate disodium salt hydrate)	5mM , 100mM Na-Acetat pH 5.0	Sigma-Aldrich (F-3627)
Fruktose-1,6 bisphosphat (D-Fructose 1,6-bisphosphate sodium salt hydrate)	5mM , 100mM Na-Acetat pH 5.0	Sigma-Aldrich (F-4757)
p-Nitrophenylphosphat (pNPP) (4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate)	5-15mM, 100mM Na-Acetat pH 5.0 (Phosphatsetest)	Fluka
BCIP	50 mg /ml in 70% Formaldehyd	Roth
NBT	50 mg /ml in 70% Formaldehyd	Roth

4.10. Sonstiges

Tabelle 26: Marker und Standards

Marker	Hersteller
Lambda DNA Marker(EcoRI / HindIII)	Fermentas
BioRad Gelfiltration Standard	Bio-Rad
PageRuler™ Prestained Proteine Ladder	Fermentas
Prestained Proteine Molecular Weight Marker	Fermentas
Test Mixture for pI Determination, pH3-10	Serva (39211)
Unstained Proteine Molecular Weight Marker	Fermentas

Tabelle 27: Kommerzielle Kits

Name	Hersteller
NucleoBond®-PC100	Machery-Nagel
NucleoSpin® Extract II	Machery-Nagel
NucleoSpin®-Plasmid	Machery-Nagel
QIAprep Midiprep tip100 und 200	Qiagen
QIAprep SpinMiniprep Kit	Qiagen
QuikChange™ II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas
Kristallisations Kit: Index; PEG / Ion; Additive Screen™	Hampton Research
Kristallisations Kit: JB Screen classic; JB Screen PEG / Salt	Jena Bioscience

4.11. Geräte, Chromatographie-Säulen und Materialien

Tabelle 28: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Agagel Mini Horizontal Elektrophoresekammer	Biometra
Dampfsterilisator Varioclav	H+T
Fast Proteine Liquid Chromatography (FPLC) Kontroller LKB Controller LCC-501 Plus, Pumpen LKB Pump P-500, UV-Detektor LKB Uvicord SII 280nm, Fraktionssammler Fraction Collector FRAC-100, P1-Pumpe, Ventile Motor Valve MV7 und Valve V-8, 50ml Superloop	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
FPLC-System: ÄKTA Purifier	GE-Healthcare
High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) Autosampler/Chromatography Compartment AS50; Gradientenpumpe GP40; isokratische Pumpe IP20; UV-Detektor AD25	Dionex GmbH, Idstein, Deutschland
Labor-pH-Meter, Knick 761 Calimatic	Knick, Berlin, Deutschland
Magnetrührer: Heidolph MR3001 und IKA RCT basic	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim, Deutschland und IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
MicroCalorimeter VP-ITC	MicroCal™ Incorporation -UK
MicroPulser Electroporator	BioRad
Mini-PROTEAN 3 Elektrophoreseapparatur	BioRad,
Pipetten 0,5µl-10µl; 2-20µl; 20µl-200µl; 100µl-1000µl, Mehrkanalpipetten: 10-100µl	Eppendorf
Plattenreader: Multiscan Acsent	Labsystems
Präzisionswaagen:MC1 und PT13100	Satorius
Rüdschüttler: INNOVA 2300	New Brunswick Scientific, New Jersey, USA

Rundschüttler: Edmund Bühler 7400 KS10	Edmund Bühler GmbH, Tübingen
Schüttelinkubator: HT	
Sorvall Zentrifuge RC5B: Rotor GS3 und SS34	Thermo Scientific
Spektralphotometer: UltroSpec 3100 pro UV/Vis	GE Healthcare
Syngene: GenGenius	Syngene
Taumelschüttler: Biometra WT17	Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermoblöcke: HLC Typ HBT-2-131 und Grant QBT2	HLC Biotech, Bovenden, Deutschland und Grant Instruments, Cambridge, UK
Thermocycler: GeneAmp®PCR System 2700	Applied Biosystems
Thermocycler: PTC100™	MJ Research Inc.
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad
Ultraschallgerät Bandelin Sonoplus HD70	BANDELIN electronic · GmbH & Co. KG, Berlin
Ultraschall-Sonde Bandelin UW70 mit Schallkopf MS73 oder Titanteller TT13	BANDELIN electronic · GmbH & Co. KG, Berlin
Universal Elektroporationsküvette 2 mm	Eurogentec Deutschland GmbH
Vortex: Vortex Genie 2	Carl Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Waagen: Satorius Analytic AC210P und PT3100	Satorius AG, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge: Biofuge pico	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge: Kühlzentrifuge: Hettig 200R (Rotor 24x3g)	Hettig GmbH & Co KG, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 29: Chromatographie-Säulen und Materialien

Materialien und Säulen	Hersteller
CM Sepharose™ Fast Flow (XK16/20)	GE-Healthcare
HiTrap Chelating HP (1ml und 5ml)	GE-Healthcare
HPLC-Säule: Mono Q 5/50 GL 5cm	Amersham Biosciences, München, Deutschland
Ni-NTA Agarose (Sepharose CL-6B)	Qiagen
Superdex 75 (HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade)	Pharmacia
TOSOHAAS TSKGel G2000 SWXL, 7.8x300mm, Partikelgröße 5µm	TOSOH Bioscience GmbH

Tabelle 30: Weitere Materialien

Material	Hersteller
48-Well-Kulturschalen	Nunc
96-Well-Kulturschalen mit Deckel (U-Well)	Nunc
96-Well-Messplatte (gerader Boden)	Greiner
Amicon Ultra 15 30K	Millipore
BD Falcon Tubes polypropylen round bottom 14ml	BD Bioscience
Dialyses Schlauch MWCO 12-16 kDa	Biozym
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1.5ml und 2.0ml	Greiner
Falcon Tubes 15ml	Greiner
Falcon Tubes 50ml	Greiner
Küvetten	Sarstedt
Mikro-Dialysierkapsel (QuixSep)	Roth
Nitrozellulose-Membran	Machery-Nagel
PCR-Stripes 8er	Biozym
PCR-Tubes	Biozym
Pipettenspitzen	Eppendorf
Pitrischalen	Greiner
Quarzküvetten	Hellma
Sperilfilter 0.45µm Porengröße	Schleicher-Schüll
Whatmanpapier	Machery-Nagel

4.12. Verwendete Software

Tabelle 31: Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop 8	Adobe
Chromas Lite 2.01	Technelysium Pty Lt
Chromeleon 6.7	Dionex
CloneManger 7 Pro	Sci Ed Cenral
Coral Draw 10	Coral Corporation
DS Gene 1.5	Accelrys
DS Viewer Pro 5.0	Accelrys
GeneSnap 7, GeneTools 3	Syngene
MS Office 2003	Microsoft
Origin 7.0	OriginLab Corporation
Peaknet 6.3	Dionex
Pymol 0.99a	DeLano Scientific
SigmaPlot 10	Systat Software Inc.
SSPS 12.0	SSPS Inc.

5. Methoden

5.1. Mikrobiologische Methoden

5.1.1. Stammhaltung

Von den Ausgangsstämmen und von den erzeugten Stämmen wurden Konserven angelegt und bei -80 °C gelagert. Dazu wurden ÜN-Kulturen mit 10% Glycerin versetzt und eingefroren.

5.1.2. Kultivierung von Mikroorganismen

5.1.2.1. Herstellung Ca^{2+} -kompetenter *E. coli* Zellen

Eine 100 ml LB-Hauptkultur wurde 1:100 von einer 5 ml über Nacht LB-Kultur angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Dann wurde die Kultur durch Zentrifugation bei 4 °C und 5000 rpm in der Sorvall-Zentrifuge RC5B (GS3-Rotor) pelletiert. Die nun folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4 °C und mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt. Das Zellpellet wurde mit einer 30 mM MgCl_2 Lösung gewaschen, erneut zentrifugiert und in 5 ml 0,1 M CaCl_2 Lösung aufgenommen. Es folgte eine Inkubation für 20 min auf Eis, bevor die Suspension bei 4 °C für 10 min und 3500 rpm im SS34-Rotor zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde in 4,3 ml eiskalter 0,1 M CaCl_2 Lösung resuspendiert und danach wurden 0,7 ml 87 %iger Glycerinlösung zugegeben. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte 1,5 ml Tubes zu 200 µl aliquotiert und bei -80 °C schockgefroren.

5.1.2.2. Transformation Ca^{2+} -kompetenter *E. coli* Zellen

Die gefrorenen Ca^{2+} -kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 5-10 µl eines Ligationsansatzes oder 1-3 µl Plasmid-DNA zugegeben und vorsichtig gemischt. Der Transformationsansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert, bevor dieser einem Hitzeschock für 90 s bei 42 °C unterzogen wurde. Die Zellen wurden für 2 min auf Eis gekühlt, dann mit 800 µl LB vermischt und der Ansatz für 1,5 h bei 37 °C, 200 rpm in Schüttler inkubiert. Ca. 200 – 300 µl des Transformationsansatzes wurden auf selektiven Kulturplatten ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

5.1.2.3. Proteinexpression

Die Expression rekombinanter Proteine erfolgte in *E. coli* BL21, BL21phoB, C41 und C43. Dazu wurden die Expressionsstämme in LB oder 2xTBY angezogen. Wahlweise erfolgte die Expression mit Laktose oder IPTG.

Tabelle 32: Übersicht über die Expressionsbedingungen

	Laktose-Induktion	IPTG-Induktion
Kulturvolumen	10 - 250 ml	10 - 50 ml
Inkubation	37 °C, 200 - 220 rpm	37 °C, 200 - 220 rpm
Vorkultur	nein	ÜN-Kultur
Induktionszeitpunkt	direkt beim Animpfen	OD ₆₀₀ 0,8
Konzentrationen	1,5 %	1 mM
Wachstumszeit	18 h	6 - 8 h

Nach der Expression wurden die Kulturen für 5 min auf Eis gehalten und danach für 10 min bei 5000 rpm und 4 °C in der Sorvall Zentrifuge unter Verwendung des GS3 Rotors pelletiert. Die Zellpellets wurden im His-Tag-Bindepuffer im Verhältnis 1:10 (Bindepuffer : Kulturvolumen) aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gehalten.

Um einen proteolytischen Abbau der Proteine zu verhindern, wurden der Zellsuspensionen 1 mM PMSF oder ein Proteaseinhibitor für bakterielle Proteinexpression nach Herstellerangaben (Sigma-Aldrich P8465) zugesetzt.

Inkorporation von Selenomethionin

Das Phasenproblem, das während der Lösung der Kristallstruktur der *Klebsiella*-Phytase auftrat, wurde durch die Methode der anormalen Diffraktion gelöst. Dazu musste das Schwefelatom des Methionins durch ein Selenatom (Selenomethionin) im Proteinkristall ersetzt werden.

Deshalb erfolgte die Expression der *Klebsiella*-Phytase in einem methionine auxotrophen Stamm B834 (Novagen) nach Transformation des pET22b(+)-1TK Expressionsplasmids. Für die Expression des Proteins wurde ein Minimalmedien (NMM) mit verschiedenen Methioninkonzentrationen verwendet (Budisa *et al.*, 1995). Die Anzucht der Kultur und die Expression erfolgten nach einer abgewandelten Methode nach Budisa und Hendrickson. (Hendrickson, Horton & LeMaster, 1990). Eine 5 ml LB-Vorkultur wurde für 6 h bei 37 °C und 200 rpm im Schüttler inkubiert und dann mit 5 ml NMM ohne Methionin gewaschen. Danach wurde eine 100 ml NMM-Kultur, welche 0,1 mM Methionin und 0,4 mM Selenomethionin beinhaltete, mit 1 ml der gewaschenen Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach ca. 12 - 14 h Inkubation wurde die Kultur erneut mit NMM ohne Methionin gewaschen und in 100 ml NMM mit 0,5 mM Selenomethionin aufgenommen. Diese Hauptkultur wurde für ca. 24 h oder bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,8 bei 37 °C und 200 rpm weiter inkubiert und dann erfolgte die Proteinexpression durch Induktion mit 1 mM IPTG. Nach 8,5 h wurde die Expressionskultur bei 5000 rpm abzentrifugiert und das Pellet im Bindepuffer für die His-Tag Reinigung aufgenommen. Die optimale Expressionsdauer wurde zuvor durch Analyse der entnommenen Proben, nach 4, 6, 8 und 24 h, im Western Blot ermittelt. Die Reinigung der His-getaggen Selenomethioninvariante der *Klebsiella*-Phytase erfolgte wie unter 5.4.4.5 oder 5.4.4.6 beschrieben. Zusätzlich wurde eine präparative Gelfiltration durchgeführt (5.4.4.7).

5.1.2.4. Kultivierung der *Arxula*- Hefestämme und die konstitutive Proteinexpression

Die Hefen wurden zunächst im YMM (Yeast Minimal Medium) angezogen (Tanaka A., 1967). Es wurde stets eine frische Kolonie der *Arxula* Transformanten p9 oder p12 für das Beimpfen verwendet. Nach 1 - 2 tätigem Wachstum bei 30 °C und 200 rpm wurden die 200 ml Hauptkulturen, bestehend aus YEPD-Medium, einem Vollmedium, beimpft und ebenfalls bei 30 °C und 200 rpm für 3 - 6 Tage inkubiert. Das Wachstum wurde durch die Messungen der OD₆₀₀ und die Phytaseexpression durch Western Blot-Analysen sowie Aktivitätsbestimmungen (YEPD-Medium) des Kulturüberstandes verfolgt. Die Reinigung der Phytase erfolgte aus den Kulturüberständen.

5.1.3. Screening nach Phytase-Mutanten

Die mittels Random Primern erzeugten Phytase-Mutanten wurden in das Expressionsplasmid pFlag-CTS-His kloniert (siehe 5.2.10) und in den Expressionstamm BL21phoB transformiert. Für das Screening wurden 5 ml LB-Vorkulturen mit Ampicillin und Tetracyclin bei 37 °C, und 200 rpm über Nacht angezogen. Es wurden 800 - 1000 µl des Phytatmediums, welches Phytat (0,065-0,15 mM (Aldrich)), Ampicillin, Tetracyclin, sowie 1 mM IPTG beinhaltete, in eine 48-Well-Platte (Nunc – Nunclon) oder 96-„deep-well“-Platte pipetiert und mit je 10 µl der Vorkultur der Zellklone angeimpft. Die 48-Well-Platte wurde mit dem dazugehörigen Deckel und Parafilm verschlossen. Die 96-„deep-well“-Platte wurde mit einer luftdurchlässigen Folie abgeklebt. Beide Platten wurden auf einem Rundschüttler bei 37 °C für mindestens 18 h inkubiert. Für die Dokumentation des Wachstums der Vorkultur wurde die OD₆₀₀ bestimmt und so die Anfangs-OD in der Expressionskultur ermittelt. Die potentiell positiven Phytase-Klone wurden durch Messen der OD₆₀₀ der Expressionskulturen (Phytatmedium) nach 18 h ermittelt. Diese Kulturplatten wurden für die Dokumentation eingescannt. In einem zweiten Wachstumstest wurden die positiven Klone nochmals überprüft. Anschließend wurden die Plasmide der positiven Klone isoliert (siehe 5.2.3.2.) und sequenziert.

5.2. Genetische Methoden

5.2.1. DNA-Fällung

5.2.1.1. Ethanolfällung

Die präparativ gewonnene DNA (Mini-Plasmidpräparation, Isolierung chromosomaler DNA) wurde mit dem 3-fachen Volumen 96 %igem Ethanol versetzt und für mindestens 30 min bei -20 °C gefällt. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 13000 rpm (Hettig). Das DNA-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach dem Lufttrocknen in 20 – 50 µl 1xTE Puffer oder A.bidest. aufgenommen.

5.2.1.2. Natriumacetat/Ethanol-fällung von DNA

Die zu fällende DNA, z.B. DNA in Restriktionsansätzen, wurde in 100 µl A.bidest. gelöst, oder auf 100 µl mit Wasser aufgefüllt und dann 10 µl einer 3 M Na-Acetat-Lösung pH 5,3 und 300 µl 96 %igem Ethanol zugegeben. Der Fällungsansatz wurde vorsichtig gemischt und für mindestens 20 min bei -20 °C inkubiert. Das Pelletieren der gefällten DNA erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 13000 rpm (Hettig). Das DNA-Pellet wurde durch Zugabe von 500 µl 70 %igem Ethanol und anschließender Zentrifugation gewaschen und dann luftgetrocknet. Die DNA wurde in 10-50 µl 1 x TE, oder A. bidest. aufgenommen.

5.2.2. Isolierung chromosomaler DNA aus *Klebiella sp. ASR1*, *Enterobacter cloacae* und *Escherischia Coli K12*

Es wurden 10 ml LB mit einer frischen Kolonie des Bakterienstammes beimpft und bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 1 inkubiert. Die LB-Flüssigkultur wurde dann für 10 min bei 4 °C und 6000 rpm in der Sorvalzentrifuge (Rotor GS3) pelletiert. Das Pellet wurde mit 1,5 ml kaltem Resuspensionspuffer aufgenommen und in ein Eppendorftube überführt. Die Zellsuspension wurde erneut für 2 min bei 4 °C und 13000 rpm (Hettigzentrifuge) pelletiert und der Überstand verworfen. Nach der Resuspension des Zellpellets in 0,7 ml Lysispuffer erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 4 °C. Dabei wurde die Suspension durch Vortexen mehrfach gemixt. Nach einer weiteren Inkubation bei 37 °C für 10 min stellte sich die Suspension viskos dar und 25 µl einer 30 %igen Sarkosyllösung und 4 µl einer ProteinaseK-Lösung wurden hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 20 min bei 70 °C und danach eine Inkubation für 2 min auf Eis, wobei die Probe mehrfach vorsichtig gemischt wurde. Nun erfolgte eine Zugabe von 0,7 ml Phenol und nach vorsichtigem Mischen eine Zentrifugation für 5 min bei RT und 13000 rpm. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Tube überführt, erneut mit 0,7 ml Phenol gemischt und wie zuvor zentrifugiert. Dieser Schritt wurde 2-3-mal wiederholt bis die weiße Interphase völlig entfernt war. Im Anschluß an diese Prozedur erfolgte eine Behandlung der wässrigen Phase mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1). Dazu wurden 0,7 ml des Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches zugegeben und anschließend für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 5 µl RNase für 10 min bei 37 °C inkubiert. Es erfolgte eine Ethanol-fällung der chromosomalen DNA durch Zugabe von 1 ml 96 % Ethanol und eine Inkubation für 10 min auf Eis. Das DNA-Pellet wurde nach Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm mit 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die chromosomale DNA wurde in 100 µl 1xTE Puffer über Nacht bei RT gelöst. Die Lagerung der chromosomalen DNA erfolgte bei 4°C.

Lösungen:

Resuspensionspuffer: 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl, 10 mM EDTA

Lysispuffer: 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM NaCl; 10 mM EDTA; Lysozym (4 mg/ml)

ProteinaseK : 20 mg/ml in 1 x TE-Puffer

RNase: 100 mg/ml in 1 x TE-Puffer

5.2.3. Plasmidpräparationen

5.2.3.1. Mini-Plasmidpräparation

Für die Miniprep wurden 1,5 ml einer ÜN-Kultur bei 4 °C für 1 min bei 13000 rpm (Hettigzentrifuge) in einem Eppendorftube pelletiert und nach Entfernen des Kulturüberstandes in 100 µl P1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl P2-Puffer zugesetzt und die Probe bis zur Klärung der Suspension vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 150 µl des P3-Puffers erfolgte eine Inkubation für 10 min auf Eis. Der Niederschlag wurde bei 4 °C für 10 min und 13000 rpm (Hettigzentrifuge) abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Tube überführt. Die im Überstand enthaltene DNA wurde mit Ethanol gefällt (siehe 5.2.1.1) und anschließend in 20-50 µl A.bidest oder 1xTE Puffer aufgenommen.

5.2.3.2. Spin-Plasmidpräparation

Die Plasmide wurden aus *E. coli* (DH5α und BL21phoB::TN10) mit Hilfe der Plasmidpräparationkits NucleoSpin-Plasmid, (Machery - Nagel) und QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Anleitungen der Hersteller gereinigt.

5.2.3.3. Midi-Plamidpräparationen

Für die Präparation größerer Plasmidmengen wurden das NucleoBond-PC100 Kit (Machery - Nagel) und das QIAprep Midiprep Kit TIP 100 und 200 (Qiagen) verwendet. Die Präparation erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben.

5.2.4. Reinigung von Nukleinsäuren

5.2.4.1. Extraktion aus dem Agarose-Gel

Nach der präparativen Agarosegelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aus dem Gel unter Verwendung des NucleoSpin® Extract II Kits (Machery-Nagel) und nach dem Protokoll des Herstellers eluiert.

5.2.5. Bestimmung der Quantität und Qualität von Nucleinsäuren (DNA)

Die DNA-Konzentrationen wurden unter Verwendung des Spektrophotometers Gene Quant II (Pharmacia) bestimmt. Die Proben wurden 1:50 bzw. 1:100 mit A. bidest. verdünnt und die Absorption bei 260 nm (E_{260}) und 280 nm (E_{280}) gemessen.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte unter folgender Bedingung:

- DNA-Konzentration (µg/ml) = E_{260} x Verdünnungsfaktor x 50 µg/ml -

Das Verhältnis (Ratio) aus E_{260} und E_{280} gab Auskunft über die Qualität der DNA. Bei einem Quotient (Ratio) von 1,8 konnte von einer ausreichenden Reinheit der DNA ausgegangen werden. Zusätzlich wurde die DNA mittels Agarosegelelektrophorese auf Konzentration und Reinheit überprüft.

5.2.6. DNA Restriktionen

Die Restriktionen wurden unter Verwendung der Protokolle, Enzyme und Puffer der Hersteller Fermentas und Qbiogen durchgeführt.

5.2.7. Dephosphorylierung von DNA

Geschnittene Plasmidvektoren wurden stets vor der Ligation dephosphoryliert, um die Religationsrate möglichst gering zu halten. Dazu wurden die 5'-Phosphatenden mit Calf Intestine Alkalischer Phosphatase (CIAP) nach Herstellerprotokoll (Fermentas) dephosphoryliert. Nach Restriktion der Plasmidvektoren wurde 1 µl der Phosphatase (10 U) direkt zum Restriktionsansatz gegeben oder ein separater Reaktionsansatz unter Verwendung des CIAP-Puffers (1x) pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung bei 65 °C (15 min) oder durch Natriumacetat/Ethanol-Fällung gestoppt (siehe 5.2.1.2).

5.2.8. Ligation von DNA

Die Ligationen wurden unter Verwendung der Anleitung und Komponenten des Rapid DNA Ligation Kits (Fermentas) durchgeführt. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert betrug im Standard-Ligationsansatz 1:3. Im Falle der Ligation mutagenisierter DNA-Inserts 1:1. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{ng Vektor} \times \text{kb Insert}}{\text{kb Vektor}} \times \text{molares Verhältnis Vektor : Insert} = \text{ng Insert}$$

5.2.9. Amplifikationen („polymerase chain reaction“ (PCR))

5.2.9.1. Standard-PCR

Die Standard-PCR wurde in 50 µl bzw 100 µl Ansätzen durchgeführt.

Die Annealing-Temperatur in der PCR lag zwischen 50 - 65 °C und wurde nach Sequenz und Homologie der Primer berechnet. Bei der Berechnung wurden für jedes A-T eine Temperatur von 2 °C und jedem G-C eine Temperatur von 4 °C zu Grunde gelegt. Die Summe aus den A-T und G-C Temperaturen abzüglich einer Temperatur von 20 °C ergab die entsprechende Annealing-Temperatur. Die Syntheszeit richtete sich nach der Länge der zu amplifizierenden DNA und betrug für 1 kb DNA etwa 1 min.

PCR-Ansatz	PCR-Programm	
	Temperatur (C°)	Zeit (min)
10-50 ng Plasmid-DNA bzw.	95	2
0,1-0,5 ng chromosomale DNA	95	1
1 x Pfu bzw. Taq – Puffer	50-65	1
200 µM dNTPs	72	1 / kb
0,5 – 1 µM Primer 1 (forward)	30 Zyklen	
0,5 – 1 µM Primer 2 (reverse)		
0,1 U / µl Pfu bzw. 1 µl Taq- Polymerase	72	8

Bei GC-reichen Templates wurden dem PCR-Ansatz 5 µl bzw. 10 µl der Q-Solution (final 10 %) zugesetzt.

5.2.9.2. SOE (splicing by overlap extension)–PCR

Die SOE-Methode wurde bei der Fusion von zwei DNA-Fragmenten verwendet. An dem Vorwärtsprimer des zweiten Fragments und dem Rückwärtsprimer des ersten Fragments erfolgte die Verknüpfung der beiden DNA-Fragmente. Die Primer wiesen eine Homologie von 20 - 25 bp auf. Die jeweiligen Fragmente wurden in einer Standard-PCR mit einer Pfu-DNA-Polymerase amplifiziert und mittels Agarose-Gel-Elektrophorese analysiert und dann extrahiert. Die beiden gereinigten DNA-Fragmente dienten als Matrize für die SOE-PCR (Tabelle 33).

In einem PCR-Ansatz, ohne Primer, erfolgte das Zusammenfügen der Fragmente. Durch Hinzufügen flankierender Primer erfolgte die Amplifikation der zusammengefügt DNA.

PCR-Ansatz
 1-10 ng DNA-Fragment 1
 1-10 ng DNA-Fragment 2
 1 x Pfu – Puffer
 200 µM dNTPs
 (0,5 – 1 µM Primer 1 (forward))
 (0,5 – 1 µM Primer 2 (reverse))
 0,1 U/µl Pfu-DNA-Polymerase

Tabelle 33: SOE-PCR Programm

<u>PCR 1</u>		<u>PCR 2</u>	
Zeit (min)	Temperatur (C°)	Zeit (min)	Temperatur (C°)
2	95	2	95
1	95	1	95
1	50-55	1	50-55
1 / kb	72	1 / kb	72
	8 Zyklen		25 Zyklen
7	72	8	72

5.2.10. Konstruktion von Plasmiden

Konstruktion der Klebsiella-Phytase-Expressionsplasmide

Es wurden zwei Expressionsplasmide pET1TK und pFlag-His-K1 konstruiert. Aus der präparierten chromosomalen DNA des *Klebsiella*-Stammes ASR1 wurde das Phytasegen (*phyK*) ohne Signalsequenz mit den Primern, Kleb TH fw und Kleb-TH rv, mit Pfu-DNA-Polymerase amplifiziert. Das gereinigte PCR-Produkt wurde mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisierten pET22B(+) Plasmidvektor (Novagen) ligiert.

Für die Mutagenesen und insbesondere für das Screening nach Phytaseaktivitäten wurde das Phytasegen mit den Primern Tom20 *phyK* fw und Tom21 *phyK* rv amplifiziert und in das *Bgl*II und *Hind*III geschnittene pFlag-CTS-His-Plasmid ligiert (pFlag-His-K1). Das pFlag-CTS-His-Plasmid wurde zuvor aus dem Plasmidvektor pFlag-CTS (Sigma-Aldrich) konstruiert. Dazu wurde der His-

Tag mittels zwei 5'-phosphorylierten Oligonukleotiden (Oligo His fw und Oligo His rv) in das *Bgl*II und *Sall* geschnittene Plasmid ligiert. Die phosphorylierten Oligonukleotide wurden zuvor im gleichen molaren Verhältnis gemischt, zusammen auf 95 °C erhitzt, langsam wieder abgekühlt und dann für die Ligation eingesetzt.

Für die Erzeugung der inaktiven Phytasemutante His25Ala (Kleb-M1) wurde eine Mutagenese des pET1TK Plasmids vorgenommen. Dies erfolgte mittels des QuikChange™ II XL Site-Directed Mutagenesis Kits und dem Primerpaar Kleb(HtoA)fw und Kleb(HtoA).

Die RP- und PM-Mutanten wurden durch SOE-PCR mit den RP- und PM-Primern sowie den flankierenden Primern N-26 und C-24 erzeugt.

Konstruktion der *E. coli*-Phytase-Expressionsplasmide

Das Phytasegen *appA* aus *Escherichia Coli* K12 wurde aus der isolierten chromosomalen DNA in einer PCR unter Verwendung der Phytaseprimer *appA* fw und *appA* rv und der Pfu-DNA-Polymerase amplifiziert. Das Gen wurde dabei ohne das native Signalpeptid amplifiziert. Nach Restriktion des PCR Produktes mit *Hind*III und *Bgl*II wurde das DNA-Fragment in das *Hind*III und *Bgl*II geschnittene pFlag-CTS-His-Plasmid ligiert (pFlag-His-*appA*).

Konstruktion der Glukose-1-Phosphat-Expressionsplasmide

Das Glukose-1-Phosphatasasegen (*agpE*) wurde in das pET22b(+)-Plasmid mit der nativen Signalsequenz ligiert. Das Gen wurde aus der isolierten chromosomalen DNA des *Enterobacter cloacae* Stammes mit den Primern OB_for1 und OB_rev unter Verwendung der Pfu-Polymerase amplifiziert. Nach Restriktion des Plasmidvektors und des PCR-Produktes mit *Nde*I und *Eco*RI wurden diese ligiert (pET-1TG1P). Zudem wurde das *agpE*-Gen in das pFlag-CTS-His-Plasmid intergriert (pFlag-His-G1P). Dazu wurde das *agpE* Gen ohne Signalsequenz mit den Primern, G1P *Hind*III fw und G1P *Bgl*II rv amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde nach Restriktion mit *Hind*III und *Bgl*II und in das linearisierte pFlag-CTS-His-Plasmid ligiert. Alle Mutagenesen wurden mit diesem Plasmid durchgeführt. Hierbei wurde die SOE-PCR-Methode angewandt und die flankierenden Primer N-26, C-24 und die PMG-Primer verwendet. Für die Erzeugung der inaktiven Phosphatasemutante His16Ala (G1P-M1) wurden das pFlag-His-G1P-Plasmid und die Primer G1P-Mut (HtoA) fw und G1P-Mut (HtoA) rv genutzt. Die Mutagenese erfolgte mit dem QuikChange™ II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene).

Konstruktion des Hefeexpressionsplasmids

Das komplette Phytasegen (*phyK*) wurde aus der chromosomalen DNA mit den Primern Tom10 und Tom11 unter Verwendung der Pfu-DNA-Polymerase amplifiziert. Das PCR-Produkt und das Plasmid pBS-TEF-PHO5 wurden mit *Eco*RI und *Bam*HI geschnitten und dann ligiert. Dieses Plasmid beinhaltet den konstitutiven *Arxula*-Promotors *TEF1* und dem *Saccharomyces cerevisiae* Terminator PHO5 (Wartmann *et al.*, 2003). Für die Transformation wurde die TEF1-*phyK*-PHO5-Kassette in das pAL-ALEU2m-Plasmid inseriert. Die Transformation in den *Arxula* G1211-Stamm und die Selektion der Transformanten erfolgte durch die Arbeitsgruppe Prof. Kunze.

5.2.10.1. Site-Directed Mutagenese

Der Austausch des katalytisch aktiven Histidinrestes zu Alanin in der *Klebsiella*-Phytase und in der Glukose-1-Phosphatase aus *Enterobacter* wurde mit dem QuikChange™ II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) durchgeführt. Die Mutagenese-PCR und die Transformation in XL1 Blue superkompetente Zellen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

5.2.10.2. Mutagenese mittels SOE-PCR

Die Mutationen im Phytase-bzw. Glukose-1-Phosphat-Gen wurden durch SOE-PCR eingefügt. Dazu wurden an den Mutationsstellen Primerpaare (RP-Primer, PM-Primer, PMG-Primer) mit den gewünschten Mutationen generiert. Der Überlappungsbereich betrug, je nach Anzahl der Mutationen, 25-30 bp. Nach Durchführung der SOE-PCR wurde das mutagenisierte Gen gereinigt, geschnitten und in das Expressionsplasmid ligiert. Die Mutationen wurden durch Sequenzierung überprüft.

5.3. Erzeugung der BL21-*appA* Deletionsmutante BL21-1T

Die *appA*-Gendeletion im bakteriellen Chromosom des BL21-Stammes erfolgte über die Erzeugung eines BL21-*E.coli*-Stammes, der einen deletierten, nicht lytischen λ -Prophagen im Genom enthielt. Unter Nutzung eines temperatursensitiven Phagenrepressors, der die Rekombinationsgene des Phagen kontrollierte, erfolgte nach Transformation der *appA*::Kan^r-Kassette die homologe Rekombination. Dabei wurde das *appA* Gen gegen die KM-Kassette ausgetauscht. Das *aphAI* Gen, wurde mit den Primern KM1 und KM2 aus dem pUK19 Plasmid (pUC19 Derivat mit KM-Resistenzgen) *aphAI* amplifiziert. Nach Reinigung des PCR-Produktes erfolgte eine weitere PCR mit den rekombinaten *appA1* und *appA2* Primern. Diese Primersequenzen beinhalteten je 40 bp der Sequenz des Phytasegens und 20 bp des *aphAI* Gens. Über die homologen *appA*-Sequenzen erfolgte die homologe Rekombination. Der BL21-Stamm wurde mit einem gewonnen P1-Phagenlysats des *E. coli* Stammes DY329 transduziert. Die Transduktion, die Selektion der Mutanten und die Transformation der *appA*::Kan^r-Kassette erfolgte strikt nach dem Protokoll von Yu (Yu *et al.*, 2000). Der Nachweis des Genknockouts durch die Insertion der *appA*::Kan^r-Kassette erfolgte durch Bestimmung der Phytaseaktivität der transformierten, positiven BL21-Transduktanten im Vergleich zu den Ausgangsstämmen, sowie durch PCR-Analysen.

5.4. Biochemische Methoden

5.4.1. Elektrophorese

5.4.1.1. Analytische und Präparative DNA-Agarosegel-Elektrophorese

Für die DNA-Elektrophorese wurden 0,8 % und 1,2 % TAE-Agarose-Gele mit verwendet. Die Elektrophoresen wurden in einer Agagel Mini Horizontal Elektrophoresekammer (Biometra) mit

einem 1xTAE Puffer bei 100 V und unter Verwendung eines Lambda-Markers (Fermentas) durchgeführt.

Bei der analytischen DNA-Gelelektrophorese wurden 5 µl der PCR oder Restriktion mit 1 µl DNA-Ladepuffer versetzt und der Elektrophorese unterzogen.

Nach Analyse der DNA-Fragmente erfolgte nach Bedarf eine präparative DNA-Elektrophorese. Dabei wurde der gesamte PCR-Ansatz oder die Restriktion mit einer entsprechenden Menge an DNA-Ladepuffer versetzt und im Gel getrennt. Nach dem Gellauf wurden die DNA-Fragmente, unter schwachem UV-Licht, aus dem Gel ausgeschnitten.

Die Dokumentation der Gele erfolgte unter UV-Licht (254 nm) in der Fotodokumentationsanlage GeneGenius und der Software GeneSnap (Synoptics).

Gelzusammensetzung: TAE-Agarosegele: 0,8 und 1,2 % Agarose in 1x TAE-Puffer, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid

5.4.1.2. SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Die SDS-PAGE erfolgte in der Mini-PROTEAN 3 (Biorad) Elektrophoresezelle mit Tris-Glycin-Puffer nach Maniatis *et al.*. Es wurden 0,75 mm dicken 10-14 % ige SDS-Gele mit einem 4 % Sammelgel verwendet (Tabelle 34). Die vorbereiteten Gele wurden feucht und bis zum Lauf bei 4 °C, maximal für eine Woche gelagert.

Die Proteinproben wurden mit 5 x SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese bei RT für 5 min zentrifugiert. Die Elektrophorese erfolgte bei RT und einer Spannung von 150 bis 180 V im 1 x SDS-Laufpuffer. Anschließend wurden die Gele gefärbt, ein Zymogramm oder ein Western Blot angefertigt.

Tabelle 34: SDS-PAGE - Gelzusammensetzung

Lösungen	Trenngel			Sammelgel
	10 %	12 %	14 %	
40 % Acryl-Bisacrylamid-Lsg.(29:1)	3 ml	3,6 ml	4,2 ml	0,5 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8.8	3,28 ml	3,28 ml	3,28 ml	-
0,5 M Tris-HCl pH 6.8	-	-	-	1,25 ml
Aqua dest.	5,52 ml	4,92 ml	4,32 ml	3,2 ml
10 % SDS	0,13 ml	0,13 ml	0,13 ml	50 µl
10 % APS	66 µl	66 µl	66 µl	25 µl
TEMED	6 µl	6 µl	6 µl	5 µl

Coomassie-Färbung

Die SDS-Gele wurden für mindestens 15 min in der Coomassielösung gefärbt. Zuvor wurden die Gele für 10 min in Entfärberlösung gewaschen, um SDS aus den Gelen zu entfernen. Nach Entfernen der Färbelösung wurden die Gele kurz mit Aqua dest. gewaschen und dann die Entfärberlösung zugegeben. Die Entfärberlösung wurde mehrfach gewechselt bis die Proteinbanden sich klar im Gel abzeichneten und der Gelhintergrund farblos war.

Coomassie-Lösung:

0,2 % Coomassie R250
0,05 % Coomassie G250
42,5 % Ethanol (96 %)
42,5 % Aqua dest.
10 % Essigsäure
5 % Methanol

Entfärberlösung

15 % Ethanol (96 %)
15 % Essigsäure
70 % Aqua dest.

Silber-Färbung

Für die Silberfärbung wurde jedes SDS-Gel zweimal für 5 min in je 100 ml 10 %iger EthanolLösung gewaschen und anschließend für 10 min mit 0,7 % Periodsäurelösung fixiert. Nach dreimaligem Waschen (3 min) der Gele mit Aqua dest. wurden diese für 1 min mit je 100 ml frisch angesetzter 0,02 %iger Natriumthiosulfatlösung inkubiert. Nun erfolgten drei Waschschrte mit A. dest. von je 20 s, bevor die Gele für 30 min mit je 100 ml 0,1 % SilbernitratLösung und 23 µl Formaldehydlösung (37 %) inkubiert wurden. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Gele für 20 s in A. dest. gewaschen und mit je 100 ml Entwicklerlösung (0,02 % Natriumthiosulfatlösung (frisch), 57 µl 37 % Formaldehyd, 6 % Natriumcarbonat) bis zum Erscheinen der Proteinbanden inkubiert. Beim Erreichen der gewünschten Farbeintensität wurden die Gele mit je 100 ml 0,05 M EDTA-Lösung gewaschen. Die Gele wurden dann fotografiert und in A. dest. aufbewahrt.

5.4.2. Western Blot

Nach der SDS-PAGE wurde das zu blottende SDS-Gel für 15 min im Blot-Puffer gewaschen. Zwei gelgroße Whatmann-Paper und eine Nitrozellulose-Membran (Machery-Nagel) wurden ebenfalls im Blot-Puffer equilibriert. Das Blotten des Gels erfolgte in einer Semi-Dry-Blotapparatur (Biorad) für 15 min bei 15 V für ein Minigel und bei 30 V für zwei Minigele. Der Aufbau des Blots erfolgte nach Angaben des Herstellers der Blotapparatur. Nach dem Blotten wurde die Membran mit Block-Puffer (Magermilch-1xTBST-Magermilch-Lösung) für 30 min geblockt und nach kurzem Waschen der Membran mit 1xTBST-Lösung die Antikörperlösung zugegeben. Der His-Tag-Antikörper wurde mit einer Verdünnung von 1:2000 und die Phytase-Antikörper mit einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Die Inkubation des Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 min mit 1xTBST-Lösung gewaschen. Die Membran wurde dann in der zweiten Antikörperlösung (Alkalische Phosphatase konjugierter Anti-Kaninchen IgG 1:10000 verdünnt) für 1 h inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 1xTBST-Lösung wurde der Blot mit 10 ml AP-Puffer, 50 µl BCIP und 50 µl NBT entwickelt. Die Reaktion wurde dann mit 20 ml 10xTE-Puffer abgestoppt.

5.4.3. Bestimmung des Isoelektrischen Punktes im IEF Gel

Für die Bestimmung des Isoelektrischen Punktes (IP) wurden IEF Fertigele pH-3-10 (Bio-Rad, Ready Gel IEF Gel, pH 3-10, 10 Well, 30 µl) verwendet. Der Gellauf erfolgte in der Biorad-Miniprotean 3 Elektrophoreseapparatur. Als Kathodenpuffer und Anodenpuffer wurden die

Fertigpuffer von Bio-Rad benutzt. Im Marker (100 µg Gesamtprotein, Serva) und in den Proben (max. 20 µl) befanden sich 50 % Glycerin. Der Lauf erfolgte bei 4 °C für 1 h bei 100 V (2 - 25 mA), dann für 1 h bei 250 V (2 - 25 mA) und abschließend für 30 min bei 500 V (2 - 25 mA). Nach dem Lauf wurde das IEF-Gel mit Coomassie gefärbt. Die Bestimmung des Isoelektrischen Punktes erfolgte durch das Abschätzen des IP's anhand des Markers.

5.4.4. Proteinreinigung

5.4.4.1. Zellaufschluss

Zellaufschluss mit Ultraschall

Nach der Proteinexpression (siehe 5.1.2.3) wurden die resuspendierten Zellen (in His-Tag-Bindepuffer) mittels Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurden 4 ml der Zellsuspension in 15 ml Falcon-Tubes überführt und bis zum Ultraschall auf Eis gehalten. Bei sehr großen Zellsuspensionen wurde ein 50 ml Becherglas für den Ultraschallaufschluss verwendet. Für den Zellaufschluss wurde das Ultraschallgerät Bandelin Sonoplus, die Ultraschallsonde Bandelin UW70 oder bei grösseren Zellsuspensionen der Schallkopf mit Titanteller verwendet. Die Zellsuspension wurde mit einer Intensität von 80 % und einem Zyklus von 60 für 30 s beschallt und danach für 10s nur auf Eis gehalten. Dies wurde 7-mal durchgeführt.

Das Zellysate wurde dann in 2 ml Tubes bei 14000 rpm (Hettigzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels eines 0,45 µm Spritzenfilters filtriert und dann für die His-Tag-Proteinreinigung (FPLC oder Ni-NTA) verwendet.

Zellaufschluss mit Lysozym und Tauen sowie Frieren

Bei sehr kleinen Expressionskulturen (10 ml Kulturen) (siehe 5.1.2.3) erfolgte der Zellaufschluss durch Zugabe von Lysozym (1 mg/ml) in Kombination mit Einfrieren und schnellem Auftauen der Zellsuspension. Die Suspension, bestehend aus dem His-Tag-Bindepuffer oder einem Resuspensionspuffer, wurde für 20 min auf Eis mit Lysozym inkubiert und dann dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37 °C schnell aufgetaut. Nun wurden 0,5 µl Benzonase (Novagene 10 kU, 70664-3) zum Verdau von Nukleinsäuren zugesetzt und der Zellaufschluss für 15 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde dann bei 14000 rpm zentrifugiert (Hettig) und der Überstand für die His-Tag-Proteinreinigung verwendet.

5.4.4.2. Vorbereitung der Hefe-Proteinproben für die FPLC

Die im YEPD-Medium oder YMM gezogenen Hefekulturen wurden in der Sorvall-Zentrifuge bei 4 °C und 5000 rpm abzentrifugiert und die Überstände gesammelt. Die Expression der Phytasen wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse sowie in Aktivitätstests überprüft. Für die SDS-PAGE wurden die Überstände einer DOC-TCA-Fällung unterzogen, um die im Überstand enthaltenen Proteine anzukonzentrieren. Nach dieser Analyse erfolgte eine Ammoniumsulfatfällung zur Ankonzentrierung der Proteine des Kulturüberstandes.

5.4.4.3. Konzentrieren und Dialyse von Proteinlösungen

Ammoniumsulfatfällung

Das Konzentrieren und Umpuffern der Proteinlösungen, insbesondere der Hefe-Kulturüberstände, erfolgte durch Aussalzen der Proteine.

Für das Aussalzen der löslichen Proteine wurde langsam, zu der 4 °C vorgekühlten Proteinlösung, fein zerstoßendes Ammoniumsulfat unter rühren bis zu einer Sättigung von 80 % zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei 4 °C weiter gerührt. Die ausgefallenden Proteine wurden durch 20-minütige Zentrifugation (Sorvall) bei 4 °C und 14000 rpm abzentrifugiert. Die sedimentierten Proteine wurden in 25 mM Natriumacetat pH 5,0 aufgenommen und gegen den gleichen Puffer dialysiert.

Dialyse

Das Umpuffern oder das Entsalzen von Proteinlösungen erfolgte durch Dialyse. Dafür wurde ein Dialyseschlauch (12 - 16 kDa Ausschlussgröße) oder bei kleineren Proben eine Dialysekammer Mikro-Dialysierkapsel (QuixSep Roth) verwendet. Der Dialyseschlauch wurde für 5 min bei 90 °C im Wasser equilibriert und dann nach Abkühlen verwendet. Die Dialyse erfolgte im ersten Schritt gegen 1 Liter Puffer für 1 h und im zweiten Schritt über unter Verwendung von 3 Litern des gleichen Puffers über Nacht.

5.4.4.4. FPLC-Reinigung (CM Sepharose™ FF)

Die Kationenaustauscherchromatographie erfolgte unter Verwendung des FPLC-Systems (Pharmacia) und einer CM Sepharose™ Fast Flow Matrix (GE Healthcare). Es wurden 25 ml des Säulenmaterials und eine XK16/20 Säule (GE Healthcare) verwendet.

Die Säule wurde zunächst mit dem 250 ml 25 mM Natriumacetat pH 5,0 und einer Flussrate von 0,5 ml /min equilibriert. Nach Start des FPLC-Programms wurde die vorbereitete Proteinlösung (nach Ammoniumsulfatfällung und Dialyse) mittels des Superloops auf die equilibrierte Säule aufgeladen. Die Chromatographie erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min und es wurden 1ml Fraktionen gesammelt. Während des Säulenlaufs wurde die Extinktion bei 280 nm verfolgt und mittels des Schreibers dokumentiert. Die gesammelten Fraktionen wurden im SDS-PAGE analysiert und einem Aktivitätstest unterzogen. Nach Ermittlung der Aktivitäten wurden die Fraktionen gepoolt. Die Probe wurde dann für weitere Analysen bei 4 °C auf Eis gelagert oder weiteren Reinigungsschritten unterzogen.

5.4.4.5. Reinigung His-getaggtter Proteine über die FPLC (HiTrap Chelating HP Säule)

Aus den Zelllysaten der Expressionskulturen (siehe 5.4.4.1) wurden die His-getaggtten Proteine mittels HiTrap Chelating HP Säulen aufgereinigt.

Die 1 ml oder 5 ml HiTrap Chelating HP Säulen (GE Healthcare) wurden nach Herstellerangaben mit 100 mM Nickelsulfatlösung für die Proteinreinigung von His-Tag-Proteinen vorbereitet. Die nickelbeladenen Säulen wurden abwechselnd mit dem 5-fachen des Säulenvolumens des His-Tag-

Bindepuffers und des His-tag-FPLC-Elutionspuffers mit 1 ml/min in der FPLC-Anlage (Pharmacia) gewaschen und schließlich mit dem His-Tag-Bindepuffer equilibriert. Die vorbereiteten Proteinlösungen (siehe 5.4.4.1) wurden über einen 50 ml Superloop mit 0,5 ml/min auf die Säulen geladen. Das Waschen der beladenen Säulen und die Elution der Proteine erfolgten durch schrittweise Erhöhung der Imidazolkonzentrationen im Puffer nach dem jeweiligen FPLC-Programm (siehe Anhang). Bei Verwendung der 1 ml Säule wurden Fraktionen von 0,5 ml und bei Verwendung der 5 ml Säulen wurden 1 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden auf Phytase- bzw. Glukose-1-Phosphataseaktivitäten überprüft und zusätzlich im SDS-PAGE analysiert, bevor sie zusammengefasst wurden. Danach wurde die Proteinprobe gegen 20 mM Tris-HCL pH 7,5 und 125 mM NaCl dialysiert und so das Imidazol entfernt.

5.4.4.6. Proteinreinigung mittels Qiagen Ni²⁺-Agarose

Für die Reinigung von mehreren His-getaggtten Proteinen gleichzeitig oder bei der Reinigung von His-getaggtten Proteinen aus kleinen Expressionsansätzen wurden Ni-NTA befüllte Säulen verwendet. Die Reinigung erfolgte bei Raumtemperatur oder im Kühlraum bei 4 °C, vorrangig aus dem Zellysats, aber auch aus dem Kulturüberstand.

Für kleine Reinigungen (Spinreinigung), Expressionskulturen bis 20 ml, wurden 50 - 80 µl der Ni-NTA-Matrix in 1 ml Spinsäulen (Machery Nagel) gefüllt und mit His-Tag-Bindepuffer equilibriert. Das Beladen, Waschen mit den verschiedenen His-Tag-Waschpuffern A-B und das Eluieren mit dem His-Tag-Elutionspuffer F erfolgte in einer Vakuumapparatur QIAVac 12 (Qiagen) unter Anlegen eines schwachen Vakuums. Die Elution erfolgte nach kurzer Inkubation mit 200 - 400 µl des His-Tag-Elutionspuffers durch Abzentrifugieren bei 3000 rpm für 5 min.

Bei Reinigungen von Proteinen aus grösseren Kulturen, ab 50 ml, wurden 15 ml Polypropylen-Säulen (Qiagen) mit 0,5 ml – 1,5 ml der Ni-NTA-Matrix befüllt und mit dem 5-fachen des Säulenvolumens equilibriert. Die Säulen wurden nach dem Beladen mit dem 5-fachen des Säulenvolumens gewaschen (His-Tag-Waschpuffer A-C). Die Elution der His-Tag-Proteine erfolgte in mehreren Schritten mit 2-3-fachen des Säulenvolumens durch die His-Tag-Elutionspuffer D-F. Dabei wurden 500 µl Fraktionen gesammelt.

Nach Elution der Proteine erfolgten Bestimmungen der Proteinkonzentrationen der Fraktionen und Aktivitätstests. Parallel wurden die Fraktionen mit den höchsten Aktivitäten oder Proteinkonzentrationen im SDS-PAGE analysiert und danach in einem Pool zusammengefasst. Die Proteinpools wurden gegen 20 mM Tris-HCLpH 7,5 und 125 mM NaCL dialysiert.

Für die Proteinreinigung aus dem Kulturüberstand wurden die Kulturüberstände von mehreren 10ml TBY Kulturen gesammelt. Nach Bestimmung der Phytase- bzw. Glukose-1-Phosphataseaktivität wurde der Überstand mit 1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 und 5 M NaCl Lösung auf die Molaritäten des His-Tag-Bindungspuffers eingestellt. Danach erfolgte die Reinigung wie schon beschrieben.

5.4.4.7. Gelfiltration mittels FPLC

Proteinreinigung durch Gelfiltration (präparativ)

Die Proteine (Phytase aus *Klebsiella* und Glukose-1 Phosphatase aus *Enterobacter*) wurden nach der His-Tag-Reinigung zusätzlich einer Gelfiltration unterzogen. Es wurde eine Superdex 75 Säule (HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade (Pharmacia)) verwendet. Die Proben wurden auf ein Volumen von 100 - 500 µl, mittels Ultrafiltration (Amicon Ultra 15 Zentrifugenfilter 30k), konzentriert und über den Superloop der FPLC-Anlage (Pharmacia) auf die mit 150 ml Puffer vorequilibrierte Säule aufgetragen. Als Laufmittel wurde ein 25 mM Tris-HCl pH 7,0 Puffer mit 150 - 300 mM NaCl verwendet und die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt und der Säulenlauf durch UV-Detektion bei 280 nm verfolgt und dokumentiert. Die gesammelten Fraktionen wurden auf Phytase- bzw. Phosphataseaktivität untersucht. Die Fraktionen mit den höchsten Aktivitäten wurden einer SDS-PAGE unterzogen und dann vereinigt.

Bestimmung der molekularen Proteingröße mittels Gelfiltration (analytisch)

Die molekulare Proteingröße der Phytase aus *Klebsilla* und der Glukose-1-Phosphatase (G1Pase) aus *Enterobacter* wurde durch Gelfiltration bestimmt. Des Weiteren wurde die Polymerisierung dieser Proteine bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Die Bestimmungen der Phytase wurden bei einem pH von 5 und 7 durchgeführt. Es wurden dazu 100 mM Natriumacetat -und Tris-HCl Puffer verwendet. Zusätzlich wurden 150 - 300 mM NaCl zu den Puffern zugesetzt.

Auf einer nach Herstellerangaben vorequilibrierten Tricorn Superdex 75 HR 10/30 oder Tricorn Superdex 200 HR 10/30 Säule (GE Healthcare) wurden 50 µg der gereinigten Proteine aufgetragen. Der Säulenlauf erfolgte unter Verwendung der beschriebenen Puffer mit einer Flussrate von 0,5 ml / min an einem ÄKTA-System. Die Retentionszeiten- bzw. Volumina wurden durch UV-Detektion bei 220 nm und 280 nm dokumentiert.

Die Größenbestimmung der G1Pase erfolgte in 100 mM Na-Acetat pH 5,0 und pH 6,0 mit 150 mM NaCl und 100 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 150 mM NaCl. Die Analysen erfolgten mit einer analytischen Gelfiltrationssäule TOSOHAAS TSG Gel G2000 SWXL. Mittels der Retentionsvolumina von Eichproteinen (BioRad-Gelfiltrationstandard) wurde eine Eichgerade erstellt und damit die molekulare Größe der Phytase und Phosphatase ermittelt. Die Eichung erfolgte bei den entsprechenden pH-Werten und für beide Säulen.

5.4.5. Trichloressigsäure-Fällung (DOC-TCA-Fällung)

Zum Konzentrieren von Proteinlösungen für die SDS-PAGE wurde die DOC-TCA-Fällung verwendet. Die Proteinlösung wurde auf ein Volumen von 1ml mit Wasser verdünnt, mit 30 µl 20 % TCA-Lösung (w/v) und 25 µl 2 % Desoxicholat-Lösung (w/v) versetzt und gut gemischt. Die Probe wurde dann für 20 min auf Eis inkubiert, danach bei 4 °C und 14000 rpm für 15 min (Hettig) abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl Aceton gewaschen, luftgetrocknet und in Wasser oder Probenpuffer aufgenommen.

5.4.6. Enzymassays

5.4.6.1. Bestimmung von freiem Phosphat und der Standard-Phytase-aktivitätstest

Bestimmung von freiem Phosphat

Die Bestimmung des freien ortho-Phosphates wurde nach der Methode nach Engelen (Engelen *et al.*, 1994) durchgeführt. Zu 150 µl der Phosphatlösung wurden 200 µl einer stets frisch angesetzten Stoppreagenzlösung zugesetzt und der Ansatz nach Vortexen für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation bei RT und 14000 rpm (Hettig) wurden 100 µl der Proben in eine 96-Well-Platte (Greiner) pipettiert und die Extinktion bei 414 nm im Plattenlesegerät (Multiskan Ascent Reader) ermittelt.

Die Kalibrierung der Stoppreagenzlösung erfolgte mit bekannten Phosphatkonzentrationen (Fluka Phosphatstandard). Der ermittelte Kalibrierungsfaktor wurde für die Phosphatkonzentrationsbestimmung verwendet.

Stoppreagenzlösung:

13,4 ml A. dest.

6,6 ml 65 % HNO₃

10,0 ml Vanadatlösung (100 ml : 235,2 mg NH₄VO₃ , 2 ml 65 % HNO₃)

10,0 ml Molybdatlösung (100 ml : 10,0 g (NH₄)MoO₄, 1 ml 25 % NH₄OH)

Der Standard-Phytaseaktivitätstest

Der Phytasetest beruht auf dem Nachweis der ortho-Phosphatfreisetzung durch die hydrolytische Abspaltung von Phosphatresten des *myo*-Inositolhexakisphosphates (Phytat) durch Phytasen oder Phosphatasen. Dem zu Grunde liegt der Phosphatnachweis nach Engelen (Engelen *et al.*, 1994).

Der Aktivitätstest wurde in 150 µl Ansätzen (Gesamtansatz) durchgeführt. Dabei wurden 15 µl Enzymlösung (Phytase, Phosphatase) mit 135 µl vorinkubierter 5 mM Natrium-Phytat-Lösung (100 mM Natriumacetat pH 5,0 mit 5 mM Na-Phytat (Aldrich)) bei 37 °C bzw. 50 °C im Thermoblock inkubiert und durch Zugabe von 200 µl der Stoppreagenzlösung nach 10 min (Inkubationszeit) abgestoppt. Die geeigneten Enzymverdünnungen wurden in Vortests ermittelt und richteten sich nach der Höhe der Phosphatfreisetzung im Test. Die Enzymverdünnungen wurden in 0,15 %iger BSA-Lösung angesetzt. Als Nullprobe wurden 135 µl des Substrates inkubiert, dann mit den 200 µl der Stoppreagenzlösung versetzt und erst jetzt 15 µl der Enzymlösung zugesetzt.

Nach 5 min Zentrifugation bei RT und 14000 rpm (Hettig) wurden 100 µl der Proben in eine 96-Well-Platte (Greiner) pipettiert und die Extinktion bei 414 nm im Plattenlesegerät (Multiskan Ascent Reader) ermittelt.

Durch Verwendung des Kalibrierungsfaktors der Stoppreagenzlösung erfolgte die Bestimmung der Phosphatkonzentration vor und nach Reaktion der Phytasen und Phosphatasen mit dem Substrat. Die Aktivität (U) wurde als freigesetztes Phosphat (µM) pro Minute (min) definiert. Unter

Einbeziehung der im Test verwendeten Volumina wurde die Volumenaktivität (U/ml) und nach Bezug auf die Proteinkonzentration der Enzyme die spezifische Aktivität (U/mg) berechnet.

Die Berechnungen erfolgten nach folgenden Formeln:

$$U/ml = \frac{\Delta \text{Extinktion (414nm)} * \text{Gesamtansatzvol. (}\mu\text{l)} * \text{Enzymverd\"unnung}}{\text{Kalibrierungsfaktor (Stoppreagenzls.}.) * \text{Enzymmengeim Ansatz (}\mu\text{l)} * \text{Inkubationszeit (min)}}$$

$$U/mg = \frac{U/ml}{\text{Proteinkonzentration (mg/ml)}}$$

Variationen des Phytaseaktivitätstests

Bei sehr geringen Phytaseaktivitäten oder geringen Enzymkonzentrationen erfolgte der Phytasetest mit längeren Inkubationszeiten (>10 min) oder höheren Enzymmengen (>15 µl). Dabei wurde die Nullprobe mit den gleichen Volumina angesetzt.

5.4.6.2. Allgemeiner Phosphataseaktivitätstest (pNPP)

Die Bestimmung der allgemeinen Phosphataseaktivität erfolgte unter Verwendung des Substrates para-Nitrophenylphosphat (pNPP). Die eingesetzte Konzentration lag zwischen 5-15 mM und wurde enzymabhängig gewählt. Dabei wurde das Substrat in 100 mM Natriumacet-Puffer pH 5,0 gelöst. Es wurden 15 µl der Enzymlösung mit 185 µl vorinkubierter Substratlösung gemischt und bei 37 °C bzw. 50 °C im Thermoblot inkubiert. Die Enzymverdünnungen wurden mit 0,15 % BSA-Lösung hergestellt. Die Reaktion wurde mit 1 ml 1 M NaOH abgestoppt. Nach Zentrifugation (Hettig) der abgestoppten Proben wurden je 300 µl in jedes Well einer 96-Well-Microtiterplatte (Greiner) pipettiert und die Extinktion bei 414 nm im Plattenlesegerät (Multiskan Ascent Reader) bestimmt. Die Kalibrierung erfolgte mit bekannten para-Nitrophenol (pNP) Konzentrationen. Der Kalibrierungsfaktor wurde für die Bestimmung der Aktivitäten verwendet. Die Aktivitäten (U) wurden als freigesetztes Phosphat (µM) pro Minute (min) definiert. Die Berechnung der Volumenaktivität und der spezifischen Aktivität erfolgte wie im Standard-Phytaseaktivitätstest.

5.4.6.3. Nachweis der Glykosylierung von Proteinen im Polyacrylamidgelen

Der Nachweis der Glykosylierung von Proteinen erfolgt durch Anfärben der Glykoproteine im Gel. In der Färbung werden Periodat-oxidierte Glykoproteine nacheinander mit Arsenit und Schiffsreagenz umgesetzt (PAS-Färbung) (Fairbanks & Steck, 1971). Das SDS wurde zuerst durch mehrfaches Waschen mit Fixierlösung (mind. 20 min) aus dem SDS-Gel entfernt. Nun wurde das Gel mit 7 % Essigsäure für zweimal 10 min behandelt und anschließend für 3 min mit Wasser gewaschen. Es erfolgte die Oxidation der Proteine in Gel durch eine einstündige Inkubation in 0,5 % Perjodsäure. Danach wurde das Gel erst für 30 min in 0,5 % Natriumarsenit mit 5 % Essigsäure und dann für 15min in 0,1 % Natriumarsenit und 5 % Essigsäure-Lösung inkubiert. Jetzt erfolgten drei weitere Inkubation mit 7 % Essigsäure für je 10 min. Für die Schiff'sche

Färbung wurde das Gel mit Schiff'schem Reagenz bedeckt und unter dem Abzug entwickelt. Nach der Entwicklung der rotgefärbten Glykoproteinbande wurde das Schiff'sche Reagenz mehrfach mit 0,1 % Natriummetabisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) und 0,01 M Salzsäure entfernt. Als die Waschlösung keine rosa Färbung mehr zeigte, wurde der Waschschrift beendet. Das gefärbte Gel wurde in der Fotodokumentationsanlage fotografiert und dann getrocknet.

5.4.7. Proteinbestimmung

5.4.7.1. Bestimmung nach Bradford

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurde das Bradfordreagenz Roti-Quant (Carl Roth) nach Herstellerangaben verdünnt und entsprechend für die Proteinbestimmung in Microtiterplatten verwendet. Die Eichung des Reagenz erfolgte mit BSA-Konzentrationen zwischen 0 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$. Die Bestimmung der Extinktionen erfolgte bei 595 nm (E_{595}) im Plattenlesegerät (Multiskan Ascent Reader). Dazu wurden 200 μl der Probe in 96-Well-Mikrotiterplatten (Greiner) pipettiert. Der über die BSA-Eichgerade ermittelte Extinktionskoeffizient wurde für die Proteinbestimmung verwendet.

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) = E_{595} (Probe - Leerwert) / Extinktionskoeffizient * Verdünnungsfaktor

5.4.7.2. UV-Proteinbestimmung bei 280 nm

Die UV-Proteinbestimmung beruht auf der Absorption der aromatischen Aminosäuren, wie Tyrosin und Tryptophan, aber auch im geringen Maße Phenylalanin, bei 280 nm. Die Methode wurde für die Konzentrationsbestimmung von gereinigten Proteinproben verwendet. Die Proteinprobe wurde 1:20 bis 1:100 mit Puffer oder Wasser in einem Volumen von 500 - 1000 μl verdünnt und in Quarzküvetten (1 ml) gemessen. Die Messung erfolgte im Ultrospec pro 3100 gegen den Probenpuffer oder Wasser als Leerwert. Es wurde ein Proteinspektrum zwischen 230 nm und 320 nm aufgenommen. Die Extinktion bei 280 nm (E_{280}) und der berechnete Extinktionskoeffizient des jeweiligen Proteins wurden für die Berechnung der Proteinkonzentration herangezogen.

Konzentration (mg/ml) = E_{280} (Probe - Leerwert) / Extinktionskoeffizient * Verdünnungsfaktor

5.4.8. Identifikation der Phytat- und InsP-Abbauprodukte mittels HPIC-Analysen

5.4.8.1. Reaktionsansätze für den Substratabbau von Phytasen und Glukose-1-Phosphatasen

Die Phytasen sowie die Glukose-1-Phosphatasemutanten wurden mit D-*myo*-Inositolhexakisphosphat (Phytat), gereinigtem D-*myo*-1,2,4,5,6-Inositolpentakiphosphat oder Abbauprodukten anderer Phytasen inkubiert. Für die Analyse der Abbauprodukte wurden

zeitabhängig Proben entnommen. Die verwendeten Enzymkonzentrationen wurden für den Vergleich zwischen den einzelnen Enzymen stets konstant gehalten.

Substratabbau durch Phytasen:

Für die Bestimmung der Abbauprodukte der Phytasen wurden 0,144 µg/ml (0,05 U/ml bezogen auf die native *Klebsiella*-Phytaseaktivität) Enzymlösung eingesetzt.

Die Reaktionen wurden im Wasserbad oder bei kleineren Ansätzen im Thermoblock bei 37 °C durchgeführt. Es wurden 5 ml der 37 °C vorgewärmten Substratlösung mit 5 ml 37 °C vorgewärmter Enzymlösung gemischt und sofort 1 ml als Nullprobe entnommen. Dabei wurde die Nullprobe mit 0,5 ml 10 %er TCA-Lösung abgestoppt und für 15 min bei RT inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde weiter bei 37° C inkubiert und zu den jeweiligen Zeitpunkten 1ml entnommen und wie beschrieben mit 0,5 ml 10 % TCA abgestoppt. Die Volumina der kleineren Reaktionsansätze wurden im gleichen Verhältnis gewählt. Die Inkubation der Ansätze erfolgte dann im Thermoblock.

Phytatabbau durch die Glukose-1-Phosphatasen:

Die Reaktionsansätze bestanden aus 200 µl Enzymlösung (13 µg oder 26 µg gereinigten Protein), 100 µl 10 % BSA-Lösung, 150 µl 200 mM Na-Acetatpuffer pH 5,0 und 450 µl der Substratlösung.

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 1 - 5 h im Thermoblock. Die Reaktion wurde mittels 450 µl 10 %iger TCA-Lösung abgestoppt.

Substratlösungen:

Phytat: 0,268 % (ca. 3 mM) Dodecasodium phytat (Sigma Aldrich); 0,15 % BSA; 200 mM Natriumacetat pH 5,0

Ins(1,2,4,5,6)P5: 3 mM gereinigtes InsP5, 0,15 % BSA, 200 mM Natriumacetat pH 5,0

Enzymlösung:

0,144 µg/ml Enzym, 0,15 % BSA (Sigma Aldrich); 200 mM Natriumacetat pH 5,0-Lösung

Enzymatischer Abbau der durch die E. coli-Phytase (AppA)-generierten Inositolphosphate:

Die gereinigte *E. coli*-Phytase wurde ebenfalls mit 0,144 µg / ml oder 0,05 U / ml in der Abbaureaktion eingesetzt. Für die Reaktion wurden 500 µl Enzymlösung mit 500 µl Substratlösung bei 37 °C inkubiert. Nach 5 min Inkubation wurde die Reaktion durch einen 10 min Hitzeinaktivierungsschritt (95 °C) gestoppt. Die hitzeinaktivierten Proben wurden nach Abkühlen bei 14000 rpm abzentrifugiert. Je 800 µl der inaktivierten Probe, 100 µl der 2,55 % BSA-Lösung und 100 µl Enzymlösung (0,144 µg/ml / 0,05 U/ml) oder der Phosphatase-Lösung (13 µg/ml) wurden für die weiteren Abbaureaktionen verwendet. Es wurden Proben von 400 µl nach 10, 20, 30, 40, 50, 60 min entnommen und mit 200 µl 10 % TCA abgestoppt. Als Nullwert diente eine Probe ohne Enzym mit der gleichen Verdünnung und zur Überprüfung der Hitzeinaktivierung eine Probe ohne Enzym, die über die gesamte Reaktionszeit mit inkubiert wurde.

Reaktionsansatz:

1 ml: 800 µl appA-Abbauprodukt, 100 µl 2,55 % BSA-Lösung, 100 µl (0,144 µg/ml) Phytase, (13 µg/ml) Phosphatase), ad. A. dest.

5.4.8.2. Durchführung der *myo*-Inositolphosphatanalysen

Je 0,5ml - 1 ml jeder Probe und Nullprobe wurde nach Zentrifugation des Überstandes in HPLC-Probenfläschchen (Agilent) überführt. Die Bestimmung wurde bei 25 °C mittels HPLC (Chromatography Compartment AS50 Dionex) durchgeführt. Die Detektion der Inositolphosphate erfolgte durch eine nach der HPLC-Säule geschaltete Säulenderivatisierung. Es wurden mit dem Autosampler (AS50 Dionex) 90 µl der Proben auf eine Anionenaustauschersäule (Mono-Q-5/50 GL Säule (Amersham) mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Die verschiedenen phosphorylierten Inositolphosphate wurden durch einen Salzsäuregradienten (Gradientenpumpe GP40 (Dionex)) von der Säule eluiert und dann im Verhältnis 2:1 mit Eisen(III)-Nitrat-Perchlorsäure-Lösung (1 g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ in 1000 ml 0,33 M HClO_4) gemischt (post column reactor (Dionex)). Der Salzsäuregradient wurde durch 0,005 M und 0,5 M Lösungen erzeugt. Dabei wurde innerhalb von 20 min die HCL-Konzentration bis auf 0,4 M in einem linearen Gradienten erhöht. Die Eisen(III)-nitrat-Perchlorsäure-Lösung wurde mit 0,5 ml/min unter Verwendung einer isokratischen Pumpe (IP20 Dionex) zum Eluat zugesetzt. Die Detektion (UV-Detektor AD25 (Dionex)) des derivatisierten Eluates erfolgte bei 290 nm. Die Daten wurden anschließend mit der Software Peaknet 6.3 (Dionex) und Chromeleon 6.7 (Dionex) ausgewertet und dokumentiert. Die Kalibrierung für die Bestimmung der Konzentrationen der verschiedenen Inositolphosphate erfolgte auf Grundlage der Analysen des Institutes für Biochemie und Molekularbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Das HPIC-Programm ist im Anhang zu finden.

5.4.9. Ermittlung der proteinspezifischen Parameter

5.4.9.1. Temperaturoptimum und Temperaturstabilität

Die Bestimmung der Temperaturoptima der Phytasen und der Glukose-1-Phosphatasen erfolgte wie im Assay unter 5.4.6.1 und 5.4.6.2 beschrieben. Die Temperaturen im Assay lagen zwischen 25 °C und 70 °C. Das Substrat wurde bei den verschiedenen Temperaturen vorinkubiert und der pH gegebenenfalls nachgestellt. Danach wurden die verdünnten Enzymproben zupipettiert und nach Ablauf der Inkubationszeit die Enzymreaktion abgestoppt.

Für die Bestimmung der Temperaturstabilität wurden die Enzymproben ohne Substrat bei Temperaturen zwischen 20 °C und 80 °C für 5 min bis 10 min vorinkubiert und nach Abkühlen der Enzymproben erfolgte die Bestimmung der Restaktivitäten mittels Phytase- und Phosphatasetest (5.4.6.1 und 5.4.6.2).

5.4.9.2. pH-Optimum und pH-Stabilität

Die Bestimmung der pH-Optima der Phytasen und Glukose-1-Phosphatasen erfolgten in den Standard-Enzymtests wie unter 5.4.6.1 und 5.4.6.2 beschrieben. Dabei wurden die Substrate in den folgenden 200 mM Puffern gelöst und der pH bei 37 °C genau eingestellt.

5 mM Substrat in 200 mM:
pH 1,0 – 3,5: Glycin-HCL
pH 3,5 – 5,5 Natriumacetat
pH 5,5 – 7,0 Bis-Tris-HCL
pH 7,0 – pH 8,5 Tris-HCL
pH 8,5-pH 10,0 Glycin-NaOH

Die Untersuchung der pH-Stabilität erfolgte durch Inkubation der verdünnten Phytase- und Phosphataseproben bei pH-Werten zwischen pH 1 und pH 10 für 1 - 3 h bei RT. Die Enzymproben wurden in den jeweiligen 20 mM Puffern verdünnt, inkubiert und danach die Aktivitäten im Phytase- oder Phosphatasetest ermittelt.

5.4.9.3. *K_m*-Wert, *k_{cat}*, *V_{max}*- Bestimmung

Die Bestimmungen der *K_m*-, *k_{cat}*- und *V_{max}*-Werte erfolgte auf Grundlage des Phytase -bzw. Phosphatasetestes. Die Substratkonzentrationen wurden zwischen 0,1 - 5 mM gewählt. Die optimale Enzymmenge und die geeigneten Zeitpunkte für die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten wurden zuvor bestimmt.

Die graphisch ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit der jeweiligen Substratkonzentrationen wurden im Michaelis-Menten-, Lineweaver-Burk- und Hanes-Diagramm aufgetragen. Dabei wurden möglichst alle drei Auftragungen für die Bestimmung der *K_m* -und *V_{max}*-Wertes berücksichtigt.

5.4.9.4. Substratspezifität

Die Ermittlung der Substratspezifität der Phytasen und der Glukose-1-Phosphatase erfolgte unter Verwendung von Phytat, Glukose-1-Phosphat (G1P), Glukose-6-Phosphat (G6P), Fruktose-1-Phosphat (F1P), Fruktose-6-Phosphat (F6P) und para-Nitrophenylphosphat (pNPP). Die verschiedenen Glukosephosphat- und Fruktosephosphat-Substrate wurden in 100 mM Natriumacetat-Puffer pH 5,0 mit finalen Konzentration von 5 mM eingesetzt. Das pNPP wurde für die Aktivitätsbestimmungen der Phytasen ebenfalls mit 5 mM, bei den Glukose-1-Phosphatase mit 10 - 15 mM, im Test verwendet. Die Bestimmung der Aktivitäten erfolgte wie in den Standardenzymtests (5.4.6.1 und 5.4.6.2).

5.4.9.5. Isotherme Titrations-Calorimetrie (ITC) der Glukose-1-Phosphatase-mutante

Die Überprüfung der Substrataffinität der Glukose-1-Phosphatase-mutante His16Ala (G1P-M1) für die Substrate Glukose-1-Phosphat, Phytat und *myo*-Inositolhexasulfat wurde die Methode der Isothermen Titrations-Calorimetrie (ITC) angewandt. Das Prinzip der isothermen Kalorimetriemessung beruht auf Bestimmung der Ausgleichtemperatur, die aufgewendet werden muß, um die Temperaturänderung der exo- oder endothermen Reaktion, bei Bindung eines Liganden, auszugleichen. Nach Auswertung können die Dissoziationskonstante K_D , die

Bindungskonstante (Assoziationskonstante) K_B , die Zahl der besetzten Bindungsstellen N und ΔH , die Enthalpie, also die Wärme, die pro Mol Bindungsprotein umgesetzt wird, ermittelt werden.

Der Ligand wurde mit einer Konzentration von 500 μM (Glukose-1-Phosphat und Phytat) mittels der Injektionsnadel schrittweise (5 - 10 μl bis zu 30-mal) zur Glukose-1-Phosphatmutante mit einer Konzentration von 25 - 50 μM in die Messzelle mit einem Volumen von 1,4 ml gegeben und die Titrationskurve (Thermogramm) aufgenommen. Die Injektionen erfolgten in Intervallen von 240 - 420 s. Die Messung erfolgte bei einer Temperatur von 37° C und bei einem pH von 5,0, der mittels eines 100 mM Na-Acetatpuffers eingestellt wurde. Der Rührer in der Messzelle wurde mit 300 rpm betrieben. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der ITC-Software und Origin 7.0.

5.5. Kristallographische Arbeiten

5.5.1. Probenvorbereitung der *Klebsiella*-Phytase

Das Protein wurde, wie unter 5.4.4.4 beschrieben, aufgereinigt und die Fraktionen, nach Analyse im SDS-PAGE, über Nacht gegen 3 l 25 mM Natriumacetat pH 5,3 und 60 mM NaCl dialysiert. Die Proteinprobe wurde dann mit einem Amicon Ultra 15 Zentrifugenfilter 30k auf eine Proteinkonzentration von ca. 10 - 15 mg/ml ankonzentriert und 1 mM TCEP oder 1 mM DTT zugegeben. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C über mehrere Wochen.

Vor dem Pipettieren der Kristallisationsansätze wurde die genaue Konzentration mittels UV-Proteinbestimmungsmethode (E_{280}) bestimmt und zusätzlich ein Proteinspektrum angefertigt.

5.5.2. Probenvorbereitung der Glukose-1-Phosphatasemutante

Die Glukose-1-Phosphatasemutante wurde durch die His-Tag-Affinitätschromatographie (siehe 5.4.4.4) gereinigt und im SDS-PAGE analysiert. Die Probe wurde ÜN gegen 3l 25 mM Natriumacetat pH 5,0 und 25 mM NaCl dialysiert. Anschließend wurde die Acetatkonzentration schrittweise durch Verwendung der Amicon Ultra 30 k Zentrifugenfilter auf 10 mM Natriumacetatpuffer mit 10 mM NaCl gesenkt und die Phosphatase auf höchstens 12 mg/ml ankonzentriert. Die ankonzentrierte Probe wurde bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert. Die Konzentration wurde vor Verwendung der Probe für die Kristallisation stets durch Bestimmung der E_{280} überprüft und gegebenenfalls neu eingestellt. Die Reinheit der Probe wurde durch Anfertigung eines Proteinspektrums überprüft.

5.5.3. Kristallisation in 96-Well-Platten

Zum Testen von möglichst vielen Kristallisationsbedingungen wurden Kristallographie-Screens verwendet (Hampton, Jena Bioscience). Die Kristallisationen erfolgten in 96-Well-Platten, dazu wurde die „sitting drop“ Methode angewandt. Die verdünnte Proteinlösung (1 μl) wurde in das Well der CrystalQuick-Platte (Greiner Bio One - 609801) vorgelegt und dann 1 μl der Reservoirlösung zugesetzt. Das Volumen der Reservoirlösung betrug 150 μl . Die Platte wurde mit einer

selbstklebenden Folie verschlossen und bei 22 °C inkubiert und regelmäßig auf Kristallbildungen kontrolliert.

5.5.4. Kristallisation in 24-Well-Platten

Bei Kristallansätzen in 24-Well-Platten (24-Well Greiner ComboPlate) wurde ein Reservoirvolumen von 500 µl und Tropfengrößen von 1,5 µl Proteinlösung und 1,5 µl der Reservoirlösung verwendet. Die Ansätze erfolgten nach der „hanging drop“ Methode mit silikonisierten Deckgläschen und nach der „sitting drop“ Methode, wobei eine Kristallisationsbrücke (CrystalBridgte - Greiner Bio One) und nicht silikonisierte Deckgläschen verwendet wurden. Jedes Well der Platte wurde mit Fett und dem Deckgläschen luftdicht verschlossen. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 22 °C.

5.5.5. Kristallisation im „Microbatch“ unter Öl

Das spezielle Kristallisationsverfahren unter Öl im „Microbatch“ erfolgte in einer mit Paraffinöl gefüllten 60-Well-Terasaki-Platte (Mikrotestplatte Greiner Bio One). In die Platte wurden 6 ml des Paraffinöls gegeben und dann vorsichtig 1,5 µl der verdünnten Proteinlösung in die Wells pipettiert. Dann wurde 1,5 µl der Kristallisationslösung zugegeben und die Platte bei 22 °C inkubiert.

6. Referenzen

- AGRANOFF, B. W. (1978). Textbook errors-Cyclitol confusion. *Trends in Biochemical Sciences* 3, N283-N285.
- BECK, J. L., DURACK, M. C., HAMILTON, S. E. & DE JERSEY, J. (1999). Irreversible inactivation of purple acid phosphatase by hydrogen peroxide and ascorbate. *J Inorg Biochem* 73, 245-52.
- BERNHARDT, P. V., SCHENK, G. & WILSON, G. J. (2004). Direct electrochemistry of porcine purple acid phosphatase (uteroferrin). *Biochemistry* 43, 10387-92.
- BERRIDGE, M. J. & IRVINE, R. F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341, 197-205.
- BILYEU, K. D., ZENG, P., COELLO, P., ZHANG, Z. J., KRISHNAN, H. B., BAILEY, A., BEUSELINCK, P. R. & POLACCO, J. C. (2008). Quantitative conversion of phytate to inorganic phosphorus in soybean seeds expressing a bacterial phytase. *Plant Physiol* 146, 468-77.
- BLATTNER, F. R., PLUNKETT, G., 3RD, BLOCH, C. A., PERNA, N. T., BURLAND, V., RILEY, M., COLLADO-VIDES, J., GLASNER, J. D., RODE, C. K., MAYHEW, G. F., GREGOR, J., DAVIS, N. W., KIRKPATRICK, H. A., GOEDEN, M. A., ROSE, D. J., MAU, B. & SHAO, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453-74.
- BOHN, L., JOSEFSEN, L., MEYER, A. S. & RASMUSSEN, S. K. (2007). Quantitative analysis of phytate globoids isolated from wheat bran and characterization of their sequential dephosphorylation by wheat phytase. *J Agric Food Chem* 55, 7547-52.
- BOHN, L., MEYER, A. S. & RASMUSSEN, S. K. (2008). Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *J Zhejiang Univ Sci B* 9, 165-91.
- BROZ, J., OLDALE, P., PERRIN-VOLTZ, A. H., RYCHEN, G., SCHULZE, J. & NUNES, C. S. (1994). Effects of supplemental phytase on performance and phosphorus utilisation in broiler chickens fed a low phosphorus diet without addition of inorganic phosphates. *Br Poult Sci* 35, 273-80.
- BUDISA, N., STEIPE, B., DEMANGE, P., ECKERSKORN, C., KELLERMANN, J. & HUBER, R. (1995). High-level biosynthetic substitution of methionine in proteins by its analogs 2-aminohexanoic acid, selenomethionine, telluromethionine and ethionine in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 230, 788-96.
- BULLOCK J. I., DUFFIN P. A., NOLAN K. B. & K., S. T. (1995). Effect of phytate on the in-vitro solubility of Al^{3+} , Ca^{2+} , Hg^{2+} and Pb^{2+} as a function of pH at 37°C. *Journal of the science of food and agriculture* 67, 507-509.
- CHENG, C. & LIM, B. L. (2006). Beta-propeller phytases in the aquatic environment. *Arch Microbiol* 185, 1-13.
- CHERYAN, M. (1980). Phytic acid interactions in food systems. *Crit Rev Food Sci Nutr* 13, 297-335.
- CHO, J., CHOI, K., DARDEN, T., REYNOLDS, P. R., PETITTE, J. N. & SHEARS, S. B. (2006). Avian multiple inositol polyphosphate phosphatase is an active phytase that can be engineered to help ameliorate the planet's "phosphate crisis". *J Biotechnol* 126, 248-59.
- CHU, H. M., GUO, R. T., LIN, T. W., CHOU, C. C., SHR, H. L., LAI, H. L., TANG, T. Y., CHENG, K. J., SELINGER, B. L. & WANG, A. H. (2004). Structures of *Selenomonas ruminantium* phytase in complex with persulfated phytate: DSP phytase fold and mechanism for sequential substrate hydrolysis. *Structure* 12, 2015-24.
- CIRRI, P., CHIARUGI, P., CAMICI, G., MANAO, G., RAUGEI, G., CAPPUGI, G. & RAMPONI, G. (1993). The role of Cys12, Cys17 and Arg18 in the catalytic mechanism of low-M(r) cytosolic phosphotyrosine protein phosphatase. *Eur J Biochem* 214, 647-57.
- COMMON, F. H. (1989). Biological availability of phosphorus for pigs. *Nature* 143, 370-380.

- COSTELLO, A. J. R., GLONEK, T. & MYERS, T. C. (1976). P-31 nuclear magnetic resonance-pH titrations of myoinositol hexaphosphat. *Carbohydrate Research* 46, 159-171.
- COTTRILL, M. A., GOLOVAN, S. P., PHILLIPS, J. P. & FORSBERG, C. W. (2002). Inositol phosphatase activity of the *Escherichia coli* agp-encoded acid glucose-1-phosphatase. *Can J Microbiol* 48, 801-9.
- DASSA, E., CAHU, M., DESJOYAUX-CHEREL, B. & BOQUET, P. L. (1982). The acid phosphatase with optimum pH of 2.5 of *Escherichia coli*. Physiological and Biochemical study. *J Biol Chem* 257, 6669-76.
- DEL POZO, J. C., ALLONA, I., RUBIO, V., LEYVA, A., DE LA PENNA, A., ARAGONCILLO, C. & PAZ-ARES, J. (1999). A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions. *Plant J* 19, 579-89.
- EECKHOUT W., D. P. M. (1994). Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Animal Feed Sci. Technol.* 47, 19-29.
- EFANOV, A. M., ZAITSEV, S. V. & BERGGREN, P. O. (1997). Inositol hexakisphosphate stimulates non-Ca²⁺-mediated and primes Ca²⁺-mediated exocytosis of insulin by activation of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4435-9.
- ENGELN, A. J., VAN DER HEEFT, F. C., RANDSDORP, P. H. & SMIT, E. L. (1994). Simple and rapid determination of phytase activity. *J AOAC Int* 77, 760-4.
- FAIRBANKS, G. & STECK, T. L. W., D. F. H. . (1971). *Biochemistry* 10, 2606.
- FLANAGAN, J. U., CASSADY, A. I., SCHENK, G., GUDDAT, L. W. & HUME, D. A. (2006). Identification and molecular modeling of a novel, plant-like, human purple acid phosphatase. *Gene* 377, 12-20.
- FREYDANK, A. C., BRANDT, W. & DRAGER, B. (2008). Protein structure modeling indicates hexahistidine-tag interference with enzyme activity. *Proteins* 72, 173-83.
- GOLOVAN, S., WANG, G., ZHANG, J. & FORSBERG, C. W. (2000). Characterization and overproduction of the *Escherichia coli* appA encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. *Can J Microbiol* 46, 59-71.
- GOLOVAN, S. P., HAYES, M. A., PHILLIPS, J. P. & FORSBERG, C. W. (2001a). Transgenic mice expressing bacterial phytase as a model for phosphorus pollution control. *Nat Biotechnol* 19, 429-33.
- GOLOVAN, S. P., MEIDINGER, R. G., AJAKIYE, A., COTTRILL, M., WIEDERKEHR, M. Z., BARNEY, D. J., PLANTE, C., POLLARD, J. W., FAN, M. Z., HAYES, M. A., LAURSEN, J., HJORTH, J. P., HACKER, R. R., PHILLIPS, J. P. & FORSBERG, C. W. (2001b). Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nat Biotechnol* 19, 741-5.
- GRASES, F., GARCIA-GONZALEZ, R., TORRES, J. J. & LLOBERA, A. (1998). Effects of phytic acid on renal stone formation in rats. *Scand J Urol Nephrol* 32, 261-5.
- GREINER, R., ALMINGER, M. L. & CARLSSON, N. G. (2001a). Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of baker's yeast. *J Agric Food Chem* 49, 2228-33.
- GREINER, R., CARLSSON, N. & ALMINGER, M. L. (2001b). Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 84, 53-62.
- GREINER, R. & CARLSSON, N. G. (2006). myo-Inositol phosphate isomers generated by the action of a phytate-degrading enzyme from *Klebsiella terrigena* on phytate. *Can J Microbiol* 52, 759-68.
- GREINER, R., HALLER, E., KONIETZNY, U. & JANY, K. D. (1997). Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Arch Biochem Biophys* 341, 201-6.
- GREINER, R., JANY, K. D. & LARSSON ALMINGER, M. (2000). Identification and Properties of myo -Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases (Phytases) from Barley (*Hordeum vulgare*). *Journal of Cereal Science* 31, 127-139.
- GREINER, R., KONIETZNY, U. & JANY, K. D. (1993). Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 303, 107-13.

- GREINER, R., LIM, B. L., CHENG, C. & CARLSSON, N. G. (2007). Pathway of phytate dephosphorylation by beta-propeller phytases of different origins. *Can J Microbiol* 53, 488-95.
- HA, N. C., OH, B. C., SHIN, S., KIM, H. J., OH, T. K., KIM, Y. O., CHOI, K. Y. & OH, B. H. (2000). Crystal structures of a novel, thermostable phytase in partially and fully calcium-loaded states. *Nat Struct Biol* 7, 147-53.
- HAHN, T., TAG, K., RIEDEL, K., UHLIG, S., BARONIAN, K., GELLISSEN, G. & KUNZE, G. (2006). A novel estrogen sensor based on recombinant *Arxula adenivorans* cells. *Biosens Bioelectron* 21, 2078-85.
- HARA, A., EBINA, S., KONDO, A. & FUNAGUMA, T. (1985). A New Type of Phytase from Pollen of *Typha latifolia* L. *Agricultural and Biological Chemistry* 49, 3539-3544.
- HAYAKAWA, T., TOMA, Y. & IGAUE, I. (1989). Purification and Characterization of Acid Phosphatases with or without Phytase Activity from Rice Bran. *Agri Biol. Chem.* 53, 1475-1483.
- HEGEMAN, C. E. & GRABAU, E. A. (2001). A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. *Plant Physiol* 126, 1598-608.
- HENDRICKSON, W. A., HORTON, J. R. & LEMASTER, D. M. (1990). Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of three-dimensional structure. *Embo J* 9, 1665-72.
- HERTER, T., BEREZINA, O. V., ZININ, N. V., VELIKODVORSKAYA, G. A., GREINER, R. & BORRIS, R. (2006). Glucose-1-phosphatase (AgpE) from *Enterobacter cloacae* displays enhanced phytase activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 70, 60-4.
- HUANG, H., LUO, H., WANG, Y., FU, D., SHAO, N., WANG, G., YANG, P. & YAO, B. (2008). A novel phytase from *Yersinia rohdei* with high phytate hydrolysis activity under low pH and strong pepsin conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 80, 417-26.
- HUANG, H., LUO, H., YANG, P., MENG, K., WANG, Y., YUAN, T., BAI, Y. & YAO, B. (2006). A novel phytase with preferable characteristics from *Yersinia intermedia*. *Biochem Biophys Res Commun* 350, 884-9.
- IUPAC-IUB. (1969). IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CON) and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). The nomenclature of cyclitols. Tentative rules. *Biochem J* 112, 17-28.
- JAKOB, C. G., LEWINSKI, K., KUCIEL, R., OSTROWSKI, W. & LEBIODA, L. (2000). Crystal structure of human prostatic acid phosphatase. *Prostate* 42, 211-8.
- JARIWALLA, R. J. (1992). Anticancer effects of phytate. *Am J Clin Nutr* 56, 609.
- JARIWALLA, R. J. (1999). Inositol hexaphosphate (IP6) as an anti-neoplastic and lipid-lowering agent. *Anticancer Res* 19, 3699-702.
- JIA, Z., BARFORD, D., FLINT, A. J. & TONKS, N. K. (1995). Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B. *Science* 268, 1754-8.
- JOG, S. P., GARCHOW, B. G., MEHTA, B. D. & MURTHY, P. P. (2005). Alkaline phytase from lily pollen: Investigation of biochemical properties. *Arch Biochem Biophys* 440, 133-40.
- JOHNSON, L. F. & TATE, M. E. (1969). Structure of phytic acids. *Canadian Journal of Biochemistry* 47(1), 63-73.
- KEROVUO, J., LAPPALAINEN, I. & REINIKAINEN, T. (2000). The metal dependence of *Bacillus subtilis* phytase. *Biochem Biophys Res Commun* 268, 365-9.
- KEROVUO, J., LAURAEUS, M., NURMINEN, P., KALKKINEN, N. & APAJALAHTI, J. (1998). Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 64, 2079-85.
- KEROVUO, J., ROUVINEN, J. & HATZACK, F. (2000). Analysis of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus* phytase: indication of a novel reaction mechanism. *Biochem J* 352 Pt 3, 623-8.
- KIM, H. W., KIM, Y. O., LEE, J. H., KIM, K. K. & KIM, Y. J. (2003). Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii*. *Biotechnol Lett* 25, 1231-4.

- KIM, Y. O., LEE, J. K., KIM, H. K., YU, J. H. & OH, T. K. (1998). Cloning of the thermostable phytase gene (phy) from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 162, 185-91.
- KONIETZNY, U. & GREINER, R. (2002). Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *International Journal of Food Science & Technology* 37, 791-812.
- KOSTREWA, D., GRUNINGER-LEITCH, F., D'ARCY, A., BROGER, C., MITCHELL, D. & VAN LOON, A. P. (1997). Crystal structure of phytase from *Aspergillus ficuum* at 2.5 Å resolution. *Nat Struct Biol* 4, 185-90.
- KOSTREWA, D., WYSS, M., D'ARCY, A. & VAN LOON, A. P. (1999). Crystal structure of *Aspergillus niger* pH 2.5 acid phosphatase at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol* 288, 965-74.
- LACOUNT, M. W., HANDY, G. & LEBIODA, L. (1998). Structural origins of L(+)-tartrate inhibition of human prostatic acid phosphatase. *J Biol Chem* 273, 30406-9.
- LEE, D. C., COTTRILL, M. A., FORSBERG, C. W. & JIA, Z. (2003). Functional insights revealed by the crystal structures of *Escherichia coli* glucose-1-phosphatase. *J Biol Chem* 278, 31412-8.
- LEE, S. H., PARK, H. J., CHUN, H. K., CHO, S. Y., CHO, S. M. & LILLEHOJ, H. S. (2006). Dietary phytic acid lowers the blood glucose level in diabetic KK mice. *Nutrition Research* 26, 474-479.
- LI, M., OSAKI, M., HONMA, M. & TADANO, T. (1997). Purification and characterization of phytase induced in tomato roots under phosphorus-deficient conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.* 43, 179-190.
- LIM, D., GOLOVAN, S., FORSBERG, C. W. & JIA, Z. (2000). Crystal structures of *Escherichia coli* phytase and its complex with phytate. *Nat Struct Biol* 7, 108-13.
- LIU, B.-L., RAFIQ, A., TZENG, Y.-M. & ROB, A. (1998). The Induction and Characterization of Phytase and Beyond - Evidence for unusually small active enzyme peptide. *Enzyme and Microbial Technology* 22, 415-424.
- LOEWUS, F. A. & MURTHY, P. P. N. (2000). Myo-Inositol metabolism in plants. *Plant Science* 150, 1-19.
- LOTT, J. N. A., OCKENDEN, I., RABOY, V. & BATTEN, G. D. (2000). Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: A global estimate. *Seed Science Research* 10, 11-33.
- LOTT, J. N. A., OCKENDEN, I., RABOY, V. & BATTEN, G. D. (2001). Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: A global estimate (Errata). *Seed Science Research* 11, 181.
- LUNG, S. C., LEUNG, A., KUANG, R., WANG, Y., LEUNG, P. & LIM, B. L. (2008). Phytase activity in tobacco (*Nicotiana tabacum*) root exudates is exhibited by a purple acid phosphatase. *Phytochemistry* 69, 365-73.
- MACBETH, M. R., SCHUBERT, H. L., VANDEMARK, A. P., LINGAM, A. T., HILL, C. P. & BASS, B. L. (2005). Inositol hexakisphosphate is bound in the ADAR2 core and required for RNA editing. *Science* 309, 1534-9.
- MAENZ, D. D., ENGELE-SCHAAN, C. M., NEWKIRK, R. W. & CLASSEN, H. L. (1999). The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase-susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal. *Animal Feed Science and Technology* 81, 177-192.
- MARTIN, C. J. & EVANS, W. J. (1986). Phytic acid-metal ion interactions. II. The effect of pH on Ca(II) binding. *J Inorg Biochem* 27, 17-30.
- MAUGENEST, S., MARTINEZ, I., GODIN, B., PEREZ, P. & LESCURE, A. M. (1999). Structure of two maize phytase genes and their spatio-temporal expression during seedling development. *Plant Mol Biol* 39, 503-14.
- MAUGENEST, S., MARTINEZ, I. & LESCURE, A. M. (1997). Cloning and characterization of a cDNA encoding a maize seedling phytase. *Biochem J* 322 (Pt 2), 511-7.
- MULLANEY, E. J. & ULLAH, A. H. (2003). The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 179-84.

- NAKANO, T., JOH, T., NARITA, K. & HAYAKAWA, T. (2000). The pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytases from wheat bran of *Triticum aestivum* L. cv. Nourin #61. *Biosci Biotechnol Biochem* 64, 995-1003.
- NOLAN, K. B., DUFFIN, P. A. & MCWEENY, D. J. (1987). Effects of phytate on mineral bioavailability. *in vitro* studies on Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} (also Cd^{2+}) solubilities in the presence of phytate. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 40, 79-85.
- ODDIE, G. W., SCHENK, G., ANGEL, N. Z., WALSH, N., GUDDAT, L. W., DE JERSEY, J., CASSADY, A. I., HAMILTON, S. E. & HUME, D. A. (2000). Structure, function, and regulation of tartrate-resistant acid phosphatase. *Bone* 27, 575-84.
- OH, B. C., CHOI, W. C., PARK, S., KIM, Y. O. & OH, T. K. (2004). Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. *Appl Microbiol Biotechnol* 63, 362-72.
- OH, B. C., KIM, M. H., YUN, B. S., CHOI, W. C., PARK, S. C., BAE, S. C. & OH, T. K. (2006). $Ca(2+)$ -inositol phosphate chelation mediates the substrate specificity of beta-propeller phytase. *Biochemistry* 45, 9531-9.
- ONOMI, S., OKAZAKI, Y. & KATAYAMA, T. (2004). Effect of dietary level of phytic acid on hepatic and serum lipid status in rats fed a high-sucrose diet. *Biosci Biotechnol Biochem* 68, 1379-81.
- ORTLUND, E., LACOUNT, M. W. & LEBIODA, L. (2003). Crystal structures of human prostatic acid phosphatase in complex with a phosphate ion and alpha-benzylaminobenzylphosphonic acid update the mechanistic picture and offer new insights into inhibitor design. *Biochemistry* 42, 383-9.
- OSTANIN, K., HARMS, E. H., STEVIS, P. E., KUCIEL, R., ZHOU, M. M. & VAN ETEN, R. L. (1992). Overexpression, site-directed mutagenesis, and mechanism of *Escherichia coli* acid phosphatase. *J Biol Chem* 267, 22830-6.
- OSTANIN, K. & VAN ETEN, R. L. (1993). Asp304 of *Escherichia coli* acid phosphatase is involved in leaving group protonation. *J Biol Chem* 268, 20778-84.
- PEN, J., VERWOERD, T. C., PARIDON, P. A. V., BEUDEKER, R. F., ELZEN, P. J. M. V. D., GEERSE, K., KLIS, J. D. V. D., VERSTEEGH, H. A. J., OUYEN, A. J. J. V. & HOEKEMA, A. (1993). Phytase-containing Transgenic Seeds as a Novel Feed Additive for Improved Phosphorus Utilization. *Bio/Technology* 11, 811-814.
- PRADEL, E. & BOQUET, P. L. (1988). Acid phosphatases of *Escherichia coli*: molecular cloning and analysis of *agp*, the structural gene for a periplasmic acid glucose phosphatase. *J Bacteriol* 170, 4916-23.
- PUHL, A. A., GREINER, R. & SELINGER, L. B. (2008). A protein tyrosine phosphatase-like inositol polyphosphatase from *Selenomonas ruminantium* subsp. *lactilytica* has specificity for the 5-phosphate of myo-inositol hexakisphosphate. *Int J Biochem Cell Biol*.
- PUHL, A. A., GRUNINGER, R. J., GREINER, R., JANZEN, T. W., MOSIMANN, S. C. & SELINGER, L. B. (2007). Kinetic and structural analysis of a bacterial protein tyrosine phosphatase-like myo-inositol polyphosphatase. *Protein Sci* 16, 1368-78.
- QUAN, C., FAN, S. & OHTA, Y. (2003). Pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by a novel phytase from *Candida krusei* WZ-001. *J Biosci Bioeng* 95, 530-3.
- R.GREINER. (1993). Reinigung, Charakterisierung und Überexpression einer Phytase aus *Escherichia coli* ATCC 33965. Universität Stuttgart, Stuttgart.
- RABOY, V. (2003). myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry* 64, 1033-43.
- RAGON, M., AUMELAS, A., CHEMARDIN, P., GALVEZ, S., MOULIN, G. & BOZE, H. (2008). Complete hydrolysis of myo-inositol hexakisphosphate by a novel phytase from *Debaryomyces castellii* CBS 2923. *Appl Microbiol Biotechnol* 78, 47-53.
- SAJIDAN, A., FAROUK, A., GREINER, R., JUNGBLUT, P., MULLER, E. C. & BORRIS, R. (2004). Molecular and physiological characterisation of a 3-phytase from soil bacterium *Klebsiella* sp. ASR1. *Appl Microbiol Biotechnol* 65, 110-8.

- SAMBROOK, J. F., E.F., MANIATIS T. . (1989). Molecular cloning. Cold Spring Harbor, N.Y. Laboratory manual, 2. Edition.
- SANDBERG, A. S., HULTHEN, L. R. & TURK, M. (1996). Dietary *Aspergillus niger* phytase increases iron absorption in humans. *J Nutr* 126, 476-80.
- SASAKAWA, N., NAKAKI, T., KAKINUMA, E. & KATO, R. (1993). Increase in inositol tris-, pentakis- and hexakisphosphates by high K⁺ stimulation in cultured rat cerebellar granule cells. *Brain Res* 623, 155-60.
- SASAKAWA, N., NAKAKI, T., KASHIMA, R., KANBA, S. & KATO, R. (1992). Stimulus-induced accumulation of inositol tetrakis-, pentakis-, and hexakisphosphates in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Neurochem* 58, 2116-23.
- SASAKAWA, N., SHARIF, M. & HANLEY, M. R. (1995). Metabolism and biological activities of inositol pentakisphosphate and inositol hexakisphosphate. *Biochem Pharmacol* 50, 137-46.
- SCHENK, G., ELLIOTT, T. W., LEUNG, E., CARRINGTON, L. E., MITIC, N., GAHAN, L. R. & GUDDAT, L. W. (2008). Crystal structures of a purple acid phosphatase, representing different steps of this enzyme's catalytic cycle. *BMC Struct Biol* 8, 6.
- SCHENK, G., GUDDAT, L. W., GE, Y., CARRINGTON, L. E., HUME, D. A., HAMILTON, S. & DE JERSEY, J. (2000a). Identification of mammalian-like purple acid phosphatases in a wide range of plants. *Gene* 250, 117-25.
- SCHENK, G., KORSINCZKY, M. L., HUME, D. A., HAMILTON, S. & DEJERSEY, J. (2000b). Purple acid phosphatases from bacteria: similarities to mammalian and plant enzymes. *Gene* 255, 419-24.
- SHEARS, S. B. (2004). How versatile are inositol phosphate kinases? *Biochem J* 377, 265-80.
- SHEDOVA, E. N., BEREZINA, O. V., KHMEL, I. A., LIPASOVA, V. A., BORRIS, R. & VELIKODVORSKAIA, G. A. (2004). [Phytase activity in some groups of bacteria. Search for and cloning of genes for bacterial phytases]. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*, 18-21.
- SHI, L., POTTS, M. & KENNELLY, P. J. (1998). The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait. *FEMS Microbiol Rev* 22, 229-53.
- SHIEH, T. R. & WARE, J. H. (1968). Survey of microorganism for the production of extracellular phytase. *Appl Microbiol* 16, 1348-51.
- SHIN, S., HA, N. C., OH, B. C., OH, T. K. & OH, B. H. (2001). Enzyme mechanism and catalytic property of beta propeller phytase. *Structure* 9, 851-8.
- SPENCER, J. D., ALLEE, G. L. & SAUBER, T. E. (2000a). Growing-finishing performance and carcass characteristics of pigs fed normal and genetically modified low-phytate corn. *J Anim Sci* 78, 1529-36.
- SPENCER, J. D., ALLEE, G. L. & SAUBER, T. E. (2000b). Phosphorus bioavailability and digestibility of normal and genetically modified low-phytate corn for pigs. *J Anim Sci* 78, 675-81.
- STORCKSDIECK GENANNT BONSMANN, S. & HURRELL, R. F. (2007). Iron-binding properties, amino acid composition, and structure of muscle tissue peptides from in vitro digestion of different meat sources. *J Food Sci* 72, S019-29.
- STRATER, N., JASPER, B., SCHOLTE, M., KREBS, B., DUFF, A. P., LANGLEY, D. B., HAN, R., AVERILL, B. A., FREEMAN, H. C. & GUSS, J. M. (2005). Crystal structures of recombinant human purple Acid phosphatase with and without an inhibitory conformation of the repression loop. *J Mol Biol* 351, 233-46.
- STROBEL, H. R. G., PARIS, PARIS, F-75015, FR) (2006). SELECTION OF PHOSPHATASE-CODING NUCLEIC ACID MOLECULES EUCODIS GMBH (Brunner Strasse 59, Wien, A-1235, AT)
- Strobel, Heike (22 rue Gramme, Paris, Paris, F-75015, FR)
- TANAKA A., O. N., FUKUI S. (1967). Studies on the formation of vitamins and their funktion in hydrocarbonat fermentation. Production of vitamins and their function in hydrocarbonat medium. *J. Ferment. Technol.* 45, 617-623.

- TORRE, M., RODRIGUEZ, A. R. & SAURA-CALIXTO, F. (1991). Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *Crit Rev Food Sci Nutr* 30, 1-22.
- TORRES, J., DOMINGUEZ, S., CERDA, M. F., OBAL, G., MEDEROS, A., IRVINE, R. F., DIAZ, A. & KREMER, C. (2005). Solution behaviour of myo-inositol hexakisphosphate in the presence of multivalent cations. Prediction of a neutral pentamagnesium species under cytosolic/nuclear conditions. *J Inorg Biochem* 99, 828-40.
- TYE, A. J., SIU, F. K., LEUNG, T. Y. & LIM, B. L. (2002). Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from *B. subtilis* 168 and *B. licheniformis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 59, 190-7.
- ULLAH, A. H. (1988). Production, rapid purification and catalytic characterization of extracellular phytase from *Aspergillus ficuum*. *Prep Biochem* 18, 443-58.
- ULLAH, A. H. & GIBSON, D. M. (1987). Extracellular phytase (E.C. 3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. *Prep Biochem* 17, 63-91.
- VAN ETEN, R. L., DAVIDSON, R., STEVIS, P. E., MACARTHUR, H. & MOORE, D. L. (1991). Covalent structure, disulfide bonding, and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase. *J Biol Chem* 266, 2313-2319.
- VATS, P. & BANERJEE, U. C. (2005). Biochemical characterisation of extracellular phytase (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) from a hyper-producing strain of *Aspergillus niger* van Teighem. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32, 141-7.
- VINCENT, J. B. & AVERILL, B. A. (1990). An enzyme with a double identity: purple acid phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase. *Faseb J* 4, 3009-14.
- VINCENT, J. B., CROWDER, M. W. & AVERILL, B. A. (1992a). Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions. *Trends Biochem Sci* 17, 105-10.
- VINCENT, J. B., CROWDER, M. W. & AVERILL, B. A. (1992b). Multiple binding sites for tetrahedral oxanion inhibitors of bovine spleen purple acid phosphatase. *Biochemistry* 31, 3033-7.
- VOGEL, A., BORCHERS, T., MARCUS, K., MEYER, H. E., KREBS, B. & SPENER, F. (2002). Heterologous expression and characterization of recombinant purple acid phosphatase from red kidney bean. *Arch Biochem Biophys* 401, 164-72.
- VUCENIK, I. & SHAMSUDDIN, A. M. (2006). Protection against cancer by dietary IP6 and inositol. *Nutr Cancer* 55, 109-25.
- WARTMANN, T., STOLTENBURG, R., BOER, E., SIEBER, H., BARTELSSEN, O., GELLISSEN, G. & KUNZE, G. (2003). The ALEU2 gene--a new component for an *Arxula adenivorans*-based expression platform. *FEMS Yeast Res* 3, 223-32.
- WYSS, M., BRUGGER, R., KRONENBERGER, A., REMY, R., FIMBEL, R., OESTERHELT, G., LEHMANN, M. & VAN LOON, A. P. (1999a). Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Appl Environ Microbiol* 65, 367-73.
- WYSS, M., PASAMONTES, L., FRIEDLEIN, A., REMY, R., TESSIER, M., KRONENBERGER, A., MIDDENDORF, A., LEHMANN, M., SCHNOEBELEN, L., ROTHLSBERGER, U., KUSZNIR, E., WAHL, G., MULLER, F., LAHM, H. W., VOGEL, K. & VAN LOON, A. P. (1999b). Biophysical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. *Appl Environ Microbiol* 65, 359-66.
- XIANG, T., LIU, Q., DEACON, A. M., KOSHY, M., KRIKSUNOV, I. A., LEI, X. G., HAO, Q. & THIEL, D. J. (2004). Crystal structure of a heat-resilient phytase from *Aspergillus fumigatus*, carrying a phosphorylated histidine. *J Mol Biol* 339, 437-45.
- YANKE, L. J., BAE, H. D., SELINGER, L. B. & CHENG, K. J. (1998). Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiology* 144 (Pt 6), 1565-73.
- YORK, J. D. (2006). Regulation of nuclear processes by inositol polyphosphates. *Biochim Biophys Acta* 1761, 552-9.
- YORK, J. D., ODOM, A. R., MURPHY, R., IVES, E. B. & WENTE, S. R. (1999). A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science* 285, 96-100.

- YU, D., ELLIS, H. M., LEE, E. C., JENKINS, N. A., COPELAND, N. G. & COURT, D. L. (2000). An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5978-83.
- ZHANG, W., GRUSZEWSKI, H. A., CHEVONE, B. I. & NESSLER, C. L. (2008). An *Arabidopsis* purple acid phosphatase with phytase activity increases foliar ascorbate. *Plant Physiol* 146, 431-40.
- ZHANG, Y., SIEBERT, R., MATTHIESEN, P., YANG, Y., HA, H. & SCHLEGELBERGER, B. (1998). Cytogenetical assignment and physical mapping of the human R-PTP-kappa gene (PTPRK) to the putative tumor suppressor gene region 6q22.2-q22.3. *Genomics* 51, 309-11.
- ZHANG, Z. Y. (2002). Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 209-34.
- ZHANG, Z. Y. (2003). Mechanistic studies on protein tyrosine phosphatases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 73, 171-220.
- ZHANG, Z. Y., WANG, Y. & DIXON, J. E. (1994a). Dissecting the catalytic mechanism of protein-tyrosine phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1624-7.
- ZHANG, Z. Y., WANG, Y., WU, L., FAUMAN, E. B., STUCKEY, J. A., SCHUBERT, H. L., SAPER, M. A. & DIXON, J. E. (1994b). The Cys(X)5Arg catalytic motif in phosphoester hydrolysis. *Biochemistry* 33, 15266-70.
- ZHAO, D. M., WANG, M., MU, X. J., SUN, M. L. & WANG, X. Y. (2007). Screening, cloning and overexpression of *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *Pichia pastoris* with favourable characteristics. *Lett Appl Microbiol* 45, 522-8.
- ZININ, N. V., SERKINA, A. V., GELFAND, M. S., SHEVELEV, A. B. & SINEOKY, S. P. (2004). Gene cloning, expression and characterization of novel phytase from *Obesumbacterium proteus*. *FEMS Microbiol Lett* 236, 283-90.

7. Anhang

7.1. Sequenzverweise des Phylogramms

Tabelle 35: Sequenzquellen

Protein	Stamm	Accession Nummer
AphA	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ASR1	AAL59317
PHO5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CAA85046
Phy	<i>Debaryomyces castellii</i>	ABN04184
Phy	<i>Debaryomyces occidentalis</i>	CAB70441
PhyA	<i>Neurospora crassa</i>	AAS94253
PhyA	<i>Aspergillus fumigatus</i>	CAD12029
PhyA	<i>Aspergillus oryzae</i>	ABE77159
PhyA	<i>Aspergillus niger</i>	AAU93518
PhyA	<i>Aspergillus usamii</i>	ABA42097
PhyA	<i>Aspergillus terreus</i>	AAB52507
PhyA	<i>Penicillium</i> sp. Q7	ABM92788
PhyA	<i>Peniophora lycii</i>	CAC48195
Agp	<i>Escherichia coli</i> K12	AAA23426
Agp	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	BAB34581
Agp	<i>Shigella flexneri</i> str. 2457T	NP_836710
Agp	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	NP_460090
Agp	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	ZP_02658556
Agp	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342	YP_002239354
Agp	<i>Providencia rettgeri</i>	CAA48288
AppA	<i>Escherichia coli</i> CFT073	NP_753046
AppA	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	NP_706903
AppA	<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr.	NP_415500
Phy	<i>Citrobacter braakii</i>	AAS45884
Phy	<i>Citrobacter freundii</i>	AAR89622
AppA	<i>Yersinia pestis</i> biovar <i>Microtus</i>	NP_993128
AppA	<i>Yersinia intermedia</i>	ABI95370
AppA	<i>Yersinia rohdei</i>	ABU98779
PhyA	<i>Obesumbacterium proteus</i>	AAQ90419
Phy	<i>Pectobacterium atrosepticum</i> SCRI1043	YP_052285
PhyK	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ASR1	AAM23271
PhyK	<i>Raoultella terrigena</i>	CAE01322
PhyM	<i>Pseudomonas syringae</i>	AAN77879
PhyX	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306	NP_644431
PhyX	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC 33913	NP_636151

7.2. Proteinalignment der sauren Histidinphosphatasen

Phytase E.co	1	---QSEPE-LKLESVVIVSRHGVRAPTKAT-QLMQDVTDPDAWPTWPFVKLGWLTTPRGGELI
Phytase Citr	1	---EEQNG-MKLERVVIVSRHGVRAPTKFT-PIMKDVTPDQWPQWDVPLGWLTPRGGELV
Phytase Yers	1	APVAIQPTGYTLERVVILSRHGVRSPTKQT-QLMNDVTPDTWPQWPVAAGYLTTPRGAQLV
Phytase Kleb	1	-----AD-WQLEKVVLSRHGIRPPTAGNREAIEAATGRPWEWTHDGLTGHGYAAV
G1P E.coli a	1	---QTVPEGYQLQQVLMMSRHNLRAPLANNGSVLEQSTPNKWPEWDVPGGQLTTKGGVLE
G1P Salmonel	1	---QTTPEGYQLQQVLMMSRHNLRAPLANNGSVLAQSTPNAWPAWDVPGGQLTTKGGVLE
G1P Klebsiel	1	QD-SAAPEGYQLQQVLMMSRHNLRAPLANNGSVLEQSTAKAWPQWDVPGGQLTTKGGVLE
Phytase E.co	56	AYLGHYQRQRLVADGLLAKKGCPSGQVAIIADVDERTRTKGEAFAAGLAPDCAITVHTQ
Phytase Citr	56	SELGQYQRLWFTSKGLLNNQTCPSPGQVAVIADTDQRTKRTGEAFLAGLAPKCIQVHYQ
Phytase Yers	60	TLMGGFYGDYFRSQGLLA-AGCPTDAVIYAQADVDQRTRLTGQAFLDGIAPGCGGLKVHYQ
Phytase Kleb	54	VNKGREGQHRYQLGLL-QAGCPTAESIYVRASPLQRTATAQALVDGAFPGCGVAIHVY
G1P E.coli a	58	VYMGHYMREWLAEQGMVKSCECPPPYTVYAYANSLQRTVATAQFFITGAFPGCDIPVHHQ
G1P Salmonel	58	VYMGHYTREWLVAQGLIPSGECPAPDVTYAYANSLQRTVATAQFFITGAFPGCDIPVHHQ
G1P Klebsiel	60	VYMGHYMREWLAQQKLVTSGECPENAVYAYANSLQRTVATAQFFITGAFPGCGIAVHHQ
Phytase E.co	116	ADTSSPDPLFNPLKTGVCQLDANVTDAL-LSRAGGSIAFTGHRQTAFRELERVLNFPQ
Phytase Citr	116	KDEEKNDPLFNPNVKGKCSFNTLKVKNAI-LERAGGNIELYTQRYQSSFRTLENVLNFSQ
Phytase Yers	119	ADLKKVDPLFHFVDAGVCKLDSTQTHKAV-EERLGGPLSELKRYAKPFAQMGEILNFAA
Phytase Kleb	113	--NGDADPLFQTDKFAATQTDPARQLAAV-KEKAG----DLAQRRQA----LAPTIQLLK
G1P E.coli a	118	EKMGTMDPTFNPVITD----DSAAFSEQA-VAAMEKELSKL--QLTDSYQLLEKIVNYKD
G1P Salmonel	118	EKMGTMDPTFNPVITDDSAAFRQAVQA--MEKARSQ----HLDESYYLLEQITHYQD
G1P Klebsiel	120	PQMGTMPTFNPVITDDSPAFAKALQAMEKERQGMQLTE-----SYKLEETMIDYRN
Phytase E.co	175	SNLCLKREKQDESCSLTQALPSELKVS--ADNVSLTGAVSLASMLTEIFLLQQAQGMF--
Phytase Citr	175	SETCKTTEKSTK-CTLPEALPSEFKVT--PDNVSLPGAWSLSSTLTEIFLLQEAQGMF--
Phytase Yers	178	SPYCKSLQQQKTKCDNFANFAANKITVNKPGTKVSLSGPLALSSTLGEIFLLQNSQAMP--
Phytase Kleb	162	QAVC----QADKPCPIFDT-PWRVEQS--KSGKTTISGLSVMANMVETLRLGWSNLPLS
G1P E.coli a	171	SPAC----KEKQCCSLVDGKNTFSAKY--QQEPGVSGPLKVGNSLVDAFTLQYYEGFPMF
G1P Salmonel	171	SPSC----KEKHQCSLIDAKDTFSANY--QQEPGVQGPLKVGNSLVDAFTLQYYEGFPMF
G1P Klebsiel	173	SPSC----KEKQVCSLSEKDTFSAGY--QQEPGVSGPLKVGNSLVDAFTLQYYEGF--
Phytase E.co	231	EP--GWGRITDSHQWNTLLSLHNAQFYLLQRTPEVARSRATPLLDLIKALTTPHPQKQA
Phytase Citr	230	QV--AWGRITGEKEWRDLSLHNAQFDLLQRTPEVARSRATPLLDIMIDTALLTNGTNR
Phytase Yers	236	DV--AWHRLTGEDNWISLLSLHNAQFDLMAKTPYIARHKGTPLLQQIETALT--LQRDA
Phytase Kleb	215	QL--AWGKIAQASQITALLPLLTENYDLSNDVLYTAQKRGSVLLNAMLDGVKPEANPNVR
G1P E.coli a	225	QV--AWGEIKSDQWKVLSKLKNGYQDSLFTSPEVARNVAKPLVSYIDKALVTD-----
G1P Salmonel	225	QV--AWGKINTDRQWKVLSKLKNGYQDSLFTSPTVARNVAAPLVKYIDKVLV-----A
G1P Klebsiel	225	KDQVAVGEITSKQWQVLSKLKNGYQDSLFTSVAVAQNVAKPLVKYIDNALVGEEANK--
Phytase E.co	289	YGVTLF----TSVLFIAGHDTNLNLANLGGALELN-WTLPGQP-DNTPPGGELVFERWRRLS
Phytase Citr	288	YGIKLP----VSLLFIAGHDTNLNLANSGALDLK-WSLPGQP-DNTPPGGELVFEKWKRTS
Phytase Yers	291	QQQTLPLSPQTKILFLGHDNTNLANIAGMLGAN-WQLPQQP-DNTPPGGGLVFELWQNP
Phytase Kleb	273	W-----LLLVAHDNIAMVRTLMNFS-WQLPGYSRGNIPGSSLVLRWRDAK
G1P E.coli a	278	---TSA----PKITVLVGHDSNIASLLTALDFKPYQLHDQN-ERTPIGGKIVFQRWHD
G1P Salmonel	276	DRVSAP-----KVTVLVGHDSNIASLLTALDFKPYQLHDQY-ERTPIGGQVLFQRWHD
G1P Klebsiel	283	-----AKVTLLVGHDSNIASLLTALDFKPYQLSGQY-ERTPIGGKLLFQRWHD
Phytase E.co	343	DNSQWIVQVSLVFQTLQMRDKTPLSL-NTPPGEVKLTLAGCEERNAQGMF----SLAGFT
Phytase Citr	342	DNTDWVQVSFVYQTLRDMRDIQPLSL-EKPAGKVDLKLIACEEKNSQGMF----SLKSFS
Phytase Yers	349	NHQRYVAVKMFYQTMGQLRNAEKLDLKNNPAGRVPAIDGCENSQGMF----QLDTFQ
Phytase Kleb	320	SGERYLRVYFQAQGLDLDLRLQTPDA-QHPMLRQEWQPGCRQRTDVGTLCPFAAIT
G1P E.coli a	330	ANRDLMKIEYVYQSAEQRLNADALT-QAPAQRVTELESGCP-IDADGFC----PMDKFD
G1P Salmonel	330	ANRDLMKIEYVYQSAEQRLNADALT-QSPAQRVTELESGCPV-DANGFC----PLDKFD
G1P Klebsiel	332	GNRDLMKIEYVYQSTEQLNADALT-QAPPQRVTELESGCPV-DDQGFC----PLETFK
Phytase E.co	398	QIVNEARIPACSL---
Phytase Citr	397	RLIKEIRVPECAVTE-
Phytase Yers	405	KKVAQAIEPACHI---
Phytase Kleb	379	QRIDRPSTPAVAMVLP
G1P E.coli a	384	SVLNEAVK-----
G1P Salmonel	384	NVMNTAAK-----
G1P Klebsiel	386	KVINEAAK-----

Abbildung 60: Proteinalignment der sauren Histidinphosphatasen (Glukose-1-Phosphatasen und Phytasen). Das Alignment wurde mit Clone Manager 7.0 und der BLOSUM 62-Matrix erzeugt. Die Aminosäuresequenzen (AS-Sequenzen) wurden ohne Signalpeptid abgeglichen. Als Referenz diente die AS-Sequenz der *E. coli*-Phytase AppA. Vergleichssignifikanz wurde 50 % gesetzt. Phytasen: Phytase E.co (*E. coli*: AppA: gi:16128946); Phytase Citro (*Citrobacter braakii*: AppA: gi: 42795098); Phytase Yers (*Yersinia intermedia*: AppA: 115345827); Phytase Kleb. (*Klebsiella sp.*: PhyK: gi:29465764); G1P *E. coli* (*E. coli*: Agp: gi:16128968); G1P Salmonel (*Salmonella enterica*: Agp: gi:168233498); G1P Klebsiel (*Klebsiella sp.*: Agp: gi:206577711)

7.3. Plasmidkarten

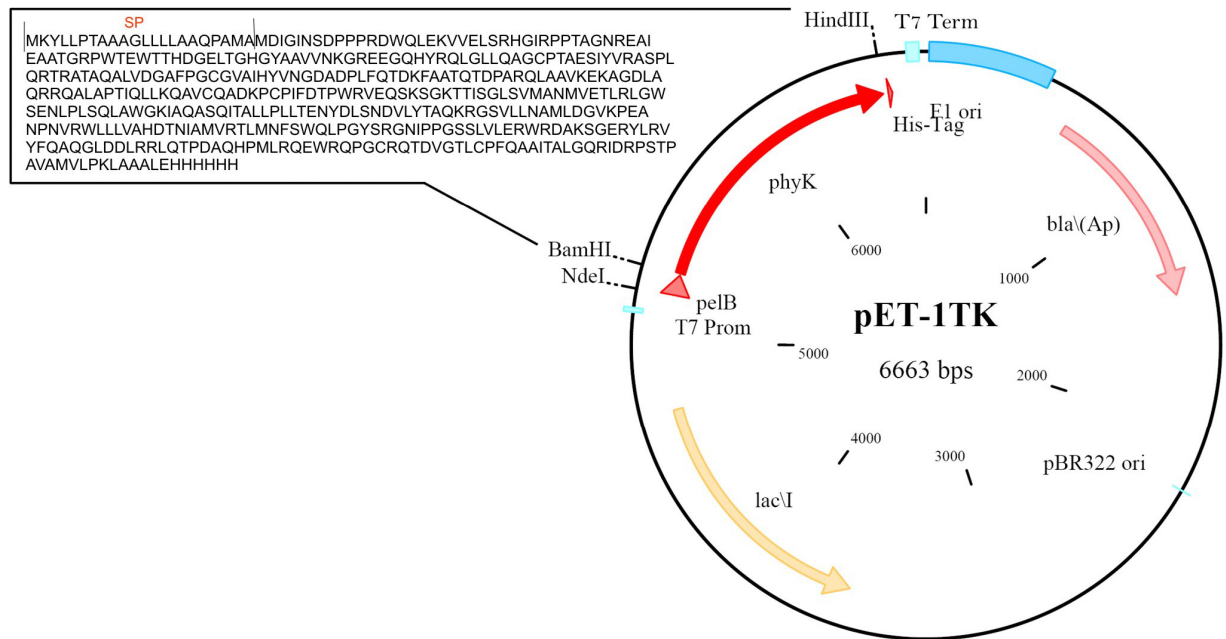


Abbildung 61: Plasmidkarte des pET-1TK-Plasmids und Aminosäuresequenz der *Klebsiella*-Phytase.

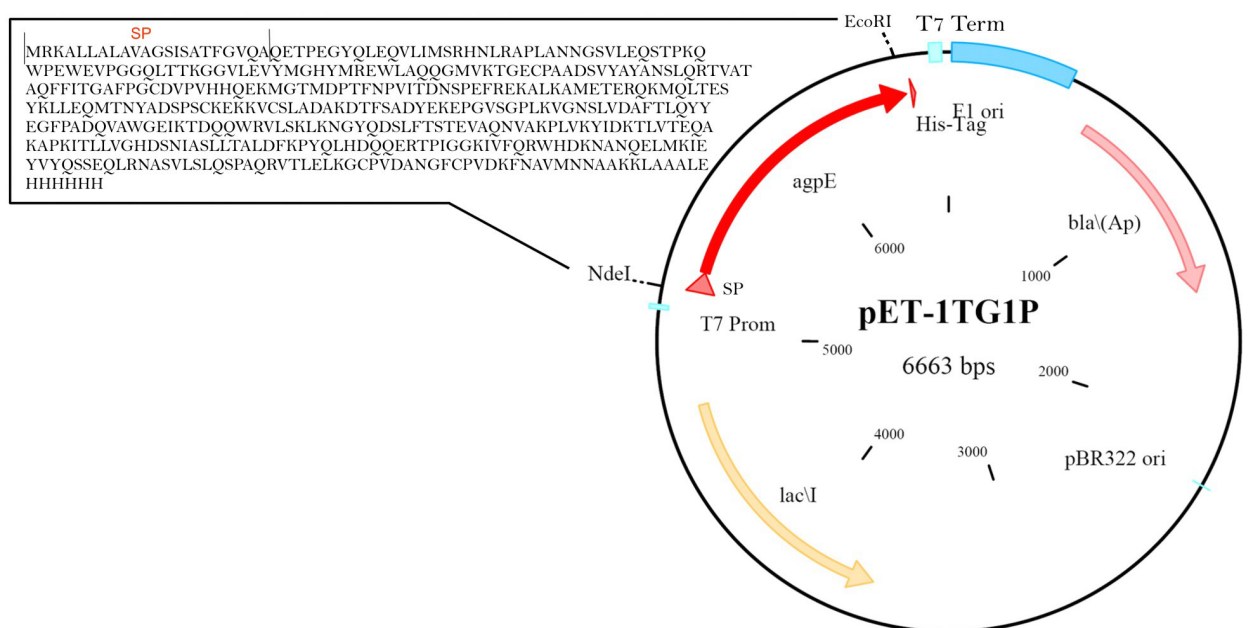


Abbildung 62: Plasmidkarte des pET-1TG1P-Plasmids und Aminosäuresequenz der Glukose-1-Phosphatase AgpE aus *Enterobacter*.

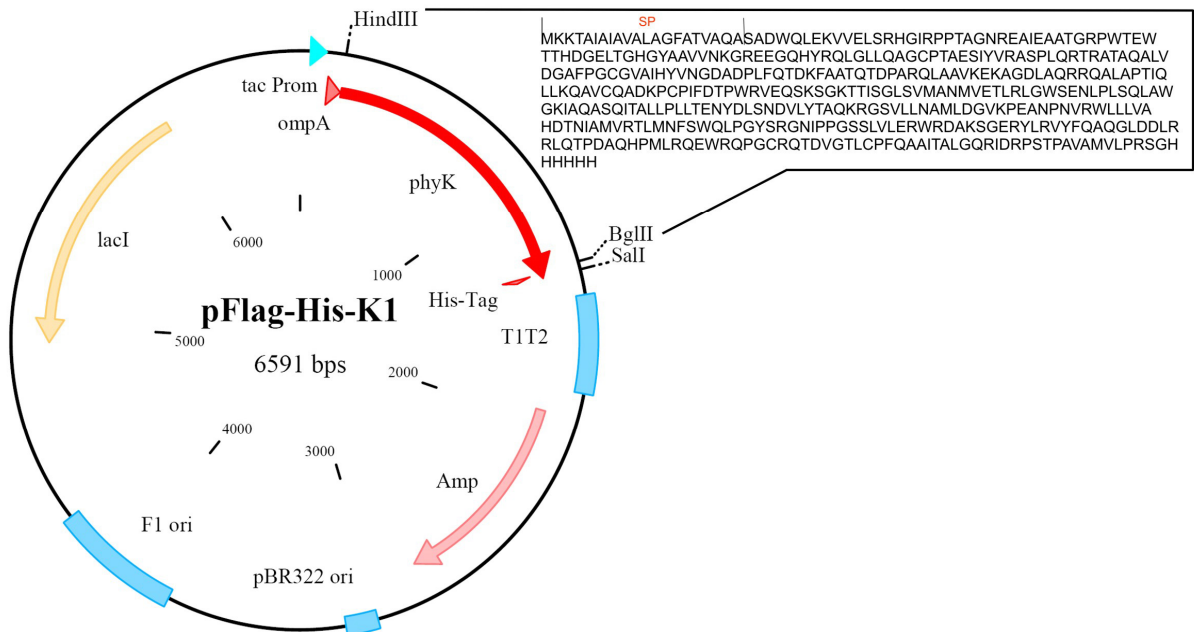


Abbildung 63: Plasmidkarte des pFlag-His-K1-Plasmids und Aminosäuresequenz der *Klebsiella*-Phytase.

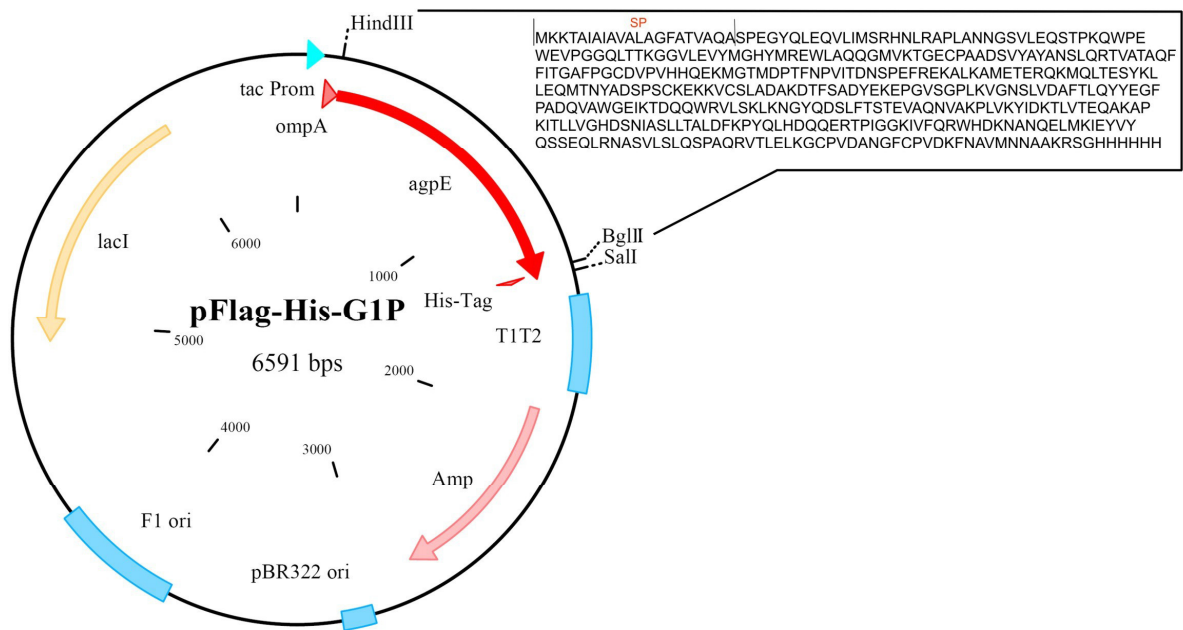


Abbildung 64: Plasmidkarte des pFlag-His-G1P-Plasmids und Aminosäuresequenz der Glukose-1-Phosphatase AgpE aus *Enterobacter*.

Tabelle 36: Mutationsprimer

Primer	Sequenz 5'-3'	Mutation
PM1 fw	CAGCTGGAGAGTGTGGTGATTGTCAGCCGCCACGGCGTGCCTGCTCCGACGGCC	PM1
PM2 rv	GGCCGTCGGAGCACGCACGCCGTGGCGGCTGACAATCACCACACTCTCCAGCTG	
PM3 fw	GAGCTTAGCCGCCACGGCATTCTGCTCCGACG	PM2
PM4 rv	CGTCGGAGCACGAATGCCGTGGCGGCTAAGCTC	
PM5 fw	GTGGAGCTTAGCCGCCACGGCGTGCCTGCTCCGACG	PM3
PM6 rv	CGTCGGAGCACGCACGCCGTGGCGGCTAAGCTCCAC	
PM7 fw	GCGCGCCAGCCCGGATCAGCGGACGCGGGCGAC	PM5
PM8 rv	GCCCGCGTCCGCTGATCCGGGCTGGCGCGCACG	
PM9 fw	GACGGCCGGCACCCGGGAAGCCATCGAGG	PM6
PM10 rv	ATGGCTTCCCGGGTGCCGGCCGTGGCGGAC	
PM11 fw	CGCTGCCGCTGCACACGGAAACTACG	PM7
PM12 rv	CAGATCGTAGTTTTCCGTGTGCAGCGGC	
PM13 fw	GCTGTCGCTGCACAACGAACTACGATCTGAGTAACG	PM8
PM14 rv	GATCGTAGTTTTGCGTTGTGCAGCGACAGCAGGGCCGTG	
PM9 fw 2	ATTTACGTGCGCGCCGACCCGCTGC	PM9
PM9 rv 2	GCGGGTGGCGCGCACGTAAATCG	
PM16 fw	ATGGCCCTTATGGTGGAAACGCTGCG	PM11
PM16 rv	CGTTTCCACCATAAGGGCCATCACGC	
PM17 fw	CAAAAGCGGCAGGACCACCATAGCG	PM12
PM17 rv	GTGGTCCTGCCGCTTTTGCTCTGC	
PM18 fw	GCGCAAAAAGAAGGGTGGTGCTGC	PM13
PM18 rv	CAGCACCGACCTTCTTTTTGCGCGG	
PM19 fw	CGAGCAGAGCAATAGCGCAAGACCACC	PM14
PM19 rv	GTCTTGCCGCTATTGCTCTGCTCGACCC	
PM20 fw	CAGACCTCGAAGTTCGCCGCCACGCAAACC	PM16
PM20 rv	GGCGGCGAACTTCGAGGTCTGAAACAGCGG	
PM21 fw	CAGACCGACGAGTTCGCCGCCACGCAAACC	PM17
PM21 rv	GGCGGCGAACTCGTCGGTCTGAAACAGCGG	
PM22 fw	CAACGGGAATGCCGATCCGCTGTTTCAGACC	PM18
PM22 rv	ACAGCGGATCGGCATCCCGTTGACGTAATGG	
PM23 fw	ATGGCCGAGATGGTGGAAACGCTGCG	PM19 (mit PM6)
PM23 rv	CGTTTCCACCATCTCGGCCATCACGC	
PM24 fw	ATGGCCAAGATGGTGGAAACGCTGCG	PM20 (mit PM6)
PM24 rv	CGTTTCCACCATCTTGGCCATCACGC	
PM25 fw	CAGAGCAAAAGCGGCTACACCACCATTAGCG	PM21
PM25 rv	GGTGGTGTAGCCGCTTTTGCTCTGCTCGACC	
Rp1 fw	GAGCTTAGCCGCCACNNNNNCGTNNNCCGACGGCCGGCAACC	RP1
Rp2 rv	GTTGCCGGCCGTCGGNNNACGNNNNNNGTGGCGGCTAAGCTCC	
Rp3 fw	CTTAGCCGCCACGGCNNNCGTNNNCCGACGGCCGGCAAC	RP2
Rp4 rv	GTTGCCGGCCGTCGGNNNACGNNNGCCGTGGCGGCTAAGC	
Rp5 fw	CATTCGTCCGCCGACGNNNNNNNNNCGGGAAGCCATCGAGG	RP3
Rp6 rv	CTCGATGGCTTCCCGNNNNNNNNNCGTCGGCGGACGAATGC	
Rp7 fw	ATTTACGTGCGCGCCNNNNNNNNNNNCGGACGCGGGCGACCGC	RP4
Rp8 rv	GTCGCCCGCGTCCGNNNNNNNNNNNNGGCGCGCACGTAAATCG	
Rp9 fw	TCGAGCAGAGCAAAAGCNNNNNNNNNACCATTAGCGGACTGAG	RP5
Rp10 rv	TCAGTCCGCTAATGGTNNNNNNNNNGCTTTTGCTCTGCTCGAC	
Rp11 fw	ACTGAGCGTGATGGCCNNNNNNNNNNNACGCTGCGTCTCGGCTGG	RP6
Rp12 rv	GCCGAGACGCAGCGTNNNNNNNNNNNNGGCCATCACGCTCAGTCC	
Rp13 fw	GCTGNNNCTGCACAACNNNVNNTACGATCTGAGTAACGAC	RP7
Rp14 rv	CTCAGATCGTANNBNNNGTTGTGCAGNNNCAGCAGGGCCG	
Rp15 fw	CCCTGCTGCCGCTGNNNACGGAAACTACG	RP8
Rp16 rv	CGTAGTTTTCCGTNNNCAGCGGCAGCAGGG	
Rp17 fw	TAACGGAAACNNNGATCTGAGTAACGACGTGC	RP9
Rp18 rv	CGTTACTCAGATCNNNGTTTTCCGTAAACAGCG	

Rp19 fw	CTACGATCTGAGTNNNGACGTGCTGTATACC	RP10
Rp20 rv	GGTATACAGCACGTCNNNACTCAGATCGTAG	
PMG-1	CGCGCGCCGACCGCCAATAACGG	PMG-I
PMG-2	CGTTATTGGCGGTCTGGCGCGCGC	
PMG-3	CGCGCCGACCGCCGGTAACGGCAGCG	PMG-II
PMG-4	CTGCCGTTACCGGCGGTCTGGCGCGCG	
PMG-7	CTATGAAGGAAAGCCTGGCGTATCCG	PMG-IV
PMG-8	CGCCAGGCTTTCCTTCATAGTCGGC	
PMG-9	GAAGAACGGCGTTCAGGACTCGCTG	PMG-V
PMG-10	GAGTCCTGAACGCCGTTCTTCAGCTTCG	
PMG-11	GGACTCGCTGGTTACCTCCACCGAAG	PMG-VI
PMG-12	GGAGGTAACCAGCGAGTCCTGATAGC	
PMG-13	GGGCACGACACGAACATTGCTTCC	PMG-VII
PMG-14	GGAAGCAATGTTCTGTCTCGTGCCC	
PMG-17	ACTATGAAAAACGGCCTGGCGTATCC	PMG-IX
PMG-18	ATACGCCAGGCCGTTTTTCATAGTCG	
PMG-19	GAAGAACGGCCAACAGGACTCGCTG	PMG-X
PMG-20	GAGTCCTGTTGGCCGTTCTTCAGCTTCG	
PMG-21	CTCGCTGGTGAACGCGTTCACGCTGC	PMG-XI
PMG-22	CGTGAACGCGTTCACCAGCGAGTTACC	
PMG-23	GAAGTGGGTAGATCGCTGGTGGACG	PMG-XII
PMG-24	CCACCAGCGATCTACCCACCTTCAGC	
PMG-25	GGGCCGCTGTCTGGTGGGTAACCTCG	PMG-XIII
PMG-26	AGTTACCCACCGACAGCGGCCCGG	

7.4. FPLC- und HPIC-Programme

7.4.1. FPLC-Programme und das Elutionsprofil

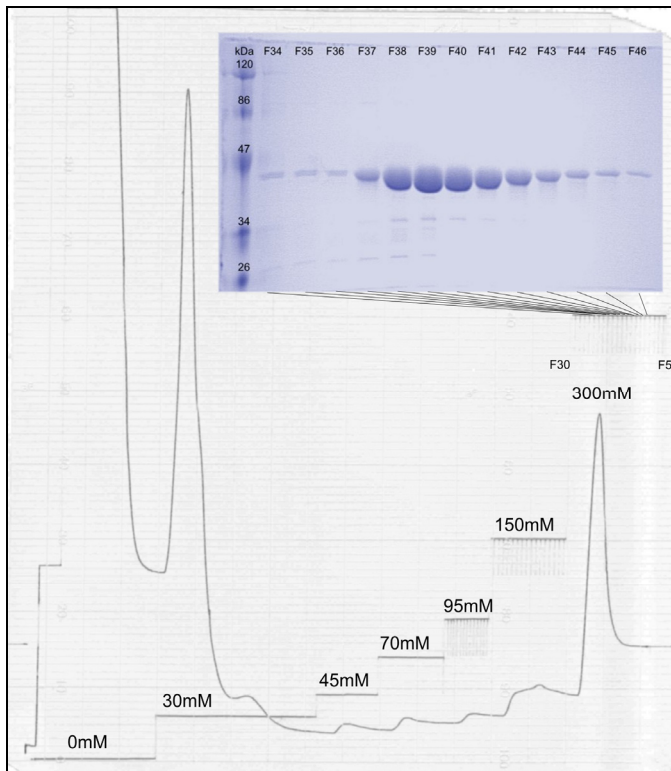


Abbildung 65: Elutionsprofil der His-Tag-Reinigung der *Klebsiella*-Phytase (FPLC-Reinigung) und SDS-Gel der Elutionsfraktionen. Die Abbildung zeigt das Elutionsprofil der *Klebsiella*-Phytasereinigung mittels der nickelbeladenen 5 ml HiTrap Chelating HP Säule. Die Säule wurde mit 15 ml des filtrierten Zelllysats der TBY-Expressionskultur (12 ml in 20 mM Tris/HCL pH 7,5, 5 mM Imidazol) beladen. Die Reinigung erfolgte wie im FPLC-Säulenprogramm beschrieben. Es wurden 12 µl der 300 mM Elutionsfraktionen in einer 12 % SDS-PAGE analysiert (siehe coomassiegefärbtes SDS-Gel). Dabei wurden 6 µl des Markers (Prestained Protein Molecular Marker (Fermentas)) aufgetragen.

Tabelle 37: FPLC-Säulenprogramme für die 1 ml und 5 ml HiTrap-Chelating HP Säulen

	1 ml HiTrap-Chelating HP Säule	5 ml HiTrap-Chelating HP Säule
Puffer	25 mM Tris-HCL pH 7,5, 500 mM NaCl, Puffer A: 5 mM Imidazol, Puffer B: 500 mM Imidazol	25 mM Tris-HCL pH 7,5, 500 mM NaCl, Puffer A: 5 mM Imidazol, Puffer B: 500 mM Imidazol
Detektor	1 AU, UV 280 nm	1 AU, UV 280 nm
Schreiber	0,5 cm/min	0,5 cm/min
Beladen	Flussrate 0,5 ml / min, 5 ml Lysat, 0 % Puffer B	Flussrate 0,5 ml /min, 10-15 ml Lysat, 0 % Puffer B
Flussrate	1 ml /min	1 ml /min
Waschschritte	3 ml 0 % Puffer B (5 mM) 10 ml 5 % Puffer B (30 mM) 5 ml 9 % Puffer B (50 mM) 5 ml 14 % Puffer B (75 mM) 3 ml 19 % Puffer B (100 mM) 5 ml 25 % Puffer B (125 mM)	10 ml 0 % Puffer B (5 mM) 30 ml 5 % Puffer B (30 mM) 15 ml 9 % Puffer B (50 mM) 15 ml 14 % Puffer B (75 mM) 10 ml 19 % Puffer B (100 mM) 16 ml 25 % Puffer B (125 mM)
Elution	5 ml 60 % Puffer B (300 mM)	20 ml 60 % Puffer B (300 mM)
Fraktionssammler	0,5 ml/min (ab 19 % Puffer B)	1 ml/min (ab 19 % Puffer B)
Regeneration der Säule	10 ml 100 % Puffer B (500 mM) 10 ml 0% Puffer B (5 mM)	20 ml 100 % Puffer B (500 mM) 40 ml 0% Puffer B (5 mM)

7.4.2. Programm der HPIC-Analysen

Programm zur Bestimmung von InsP6-InsP2 mit Nachsäulenaddition Eisen(III)-Nitrat-Perchlorsäure-Lösung

```

Pump.Pressure.UpperLimit = 3500
Pump.Pressure.LowerLimit = 0
Pump.%A.Equate = "%A"
%B.Equate = "%B"
%C.Equate = "%C"
%D.Equate = "%D"
Pump_IP20.Pressure.UpperLimit = 1000
Pump_IP20.Pressure.LowerLimit = 0
Pump_IP20.%A.Equate = "Deri.lsg."
Flush Volume = 500
Wait FlushState
NeedleHeight = 0
CutSegmentVolume = 0
SyringeSpeed = 3
TrayTemperature = Off
Cycle = 0
UV.Data_Collection_Rate = 5.00
UV.Rise_Time = 1.0
Wavelength = 290
UV_Lamp = On
Visible_Lamp = On

WaitForTemperature = False
Wait SamplePrep
Pump_IP20.Flow = 0.5
-0.500 UV.Autozero
0.000 Pump.Flow = 1
%B = 0.0
%C = 0.0
%D = 0.0
Curve = 5

Load
Wait CycleTimeState
Inject
Wait InjectState
UV_VIS_1.AcqOn
Pump.Flow = 1
%B = 0.0
%C = 0.0
%D = 0.0
Curve = 5
20.000 Pump.Flow = 1
%B = 80.0
%C = 0.0
%D = 0.0
Curve = 5
22.000 Pump.Flow = 1
%B = 80.0
%C = 0.0
%D = 0.0
Curve = 5
24.000 Pump.Flow = 1
%B = 0.0
%C = 0.0
%D = 0.0
Curve = 5
32.000 UV_VIS_1.AcqOff
Pump.Flow = 1
%B = 0.0
%C = 0.0
%D = 0.0
Curve = 5
End

```

7.4.3. Kalibrierung der HPIC

Tabelle 38: Kalibrierung nach Optiphos. Analyse und Konzentrationsbestimmungen (μM) der durch die *E.coli*-Phytase (Optiphos) generierten Phytatabbauprodukte.

Optiphos	KS006: O0+	KS007: O15+	KS008: O45+	KS009: O90+	KS010: O120+
min	0	15	45	90	120
DL-Ins(1,2)P2	0	0	4,636830159	52,44923407	84,4002584
DL-Ins(126)P3 / DL-Ins(124)P3	0	2,463094471	90,81202413	424,6440007	478,7437762
DL-Ins(1,2,4,5)P4	0	16,23700609	84,69758015	10,5312733	3,679029397
DL-Ins(1,2,5,6)P4	3,623434571	80,32641098	514,31806	488,8944438	416,3808669
l(1,4,5,6)P4					
DL-Ins(1,2,3,4,6)P5	2,235347396	1,387141215	0,478509266	0	0
DL-Ins(1,2,3,4,5)P5	8,711411125	250,9412751	158,2713701	4,794642939	1,03107609
DL-InsI(1,2,4,5,6)P5	11,96647764	51,18340642	35,69553387	2,804848307	2,509614768
DL-Ins(1,3,4,5,6)P5	1,951993518	4,400863022	0,778008625	1,353458717	0,39445416
IP6	974,7655921	598,0991548	113,9093336	17,02861829	13,46758552
Summe [μM]	1000	1000	1000	1000	1000

Tabelle 39: Kalibrierung nach Natuphos. Analyse und Konzentrationsbestimmungen (μM) der durch die *Aspergillus*-Phytase (Natuphos) generierten Phytatabbauprodukte.

Natuphos	KS001: N0+	KS002: N15+	KS003: N45+	KS004: N90+	KS005: N120+
min	0	15	45	90	120
DL-Ins(1,2)P2	0	0	0	20,66320077	77,79058131
DL-Ins(126)P3 / DL-Ins(124)P3	0	4,257687185	65,80045584	279,888339	319,4137297
DL-Ins(1,2,4,5)P4	0	8,264842675	50,2765956	90,69511231	73,92058478
DL-Ins(1,2,5,6)P4	4,12724417	28,31681621	125,2521817	183,8146696	205,4883646
l(1,4,5,6)P4	0	0	0,270823311	0,323249463	0
DL-Ins(1,2,3,4,6)P5	1,998578767	1,332805274	0,633355767	0,586491285	0,639791799
DL-Ins(1,2,3,4,5)P5	8,753268432	25,26167015	29,43325019	17,20908066	11,74904526
DL-InsI(1,2,4,5,6)P5	16,58230528	240,6676272	367,0474303	284,5750038	229,2414801
DL-Ins(1,3,4,5,6)P5	0,430712981	0	0	0	0
IP6	970,4369733	693,7620488	361,8825794	136,6268141	82,18295029
Summe [μM]	1000	1000	1000	1000	1000

Tabelle 40: Kristallisationsbedingungen

Ausgangspunkt: 12% PEG4000, 0,1M Na-Acetat pH 4.6, 0,2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8mg/ml (25mM Na-Acetat pH 5.3, 60mM NaCl, 1mM DTT, 3mM Phytat), 22°C		
Variationen	Wirkung	Optimum
PEG-Ion-Screen (Hampton)	Es waren Kristalle (kleine Nadeln verwachsen) bei 20%PEG3350, 0,2M MgSO_4 zu beobachten.	Eine Kristallbildung unter PEG- und Sulfatbedingungen wurde beobachtet
PEG-Ion-Screen pH eingestellt mit 0,1M Na-Acetat pH4.5	Kleine, nadelförmige Kristalle wurden bei 20%PEG3350, 0,2M LiSO_4 , Na_2SO_4 , K_2SO_4 im Ansatz beobachtet.	Ein pH von 4-5 und Sulfate begünstigten die Kristallbildung.
PEG Variation	Kristalle (Nadeln mit glatten Kanten), entstanden bei 0,1M Na-Acetat pH 4.5 mit 12% PEG4000; 18% PEG4000 mit 0,2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Bei 18%PEG8000 mit 0,1-0,2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entstanden größere Kristalle mit Defekten.	PEG 4000 und PEG 8000 mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei einem von pH4.5 begünstigten die Kristallisation.
PEG8000 Variation	größere Kristalle mit Defekten (Abb 10D)) 14-15% PEG 8000, 0,1M Na-Acetat pH 4.5, 0,1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wurden beobachtet.	Eine PEG8000 von 15% wurde favorisiert.
Variation der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Keine Kristallbildung bei hohen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Konzentrationen (0,3-0,4M)	Die optimale $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration lag bei

Konzentration		0,1-0,2M wenn mit PEG8000 kristallisiert wurde.
Tropfengröße, Reservoirvolumen und Proteinkonzentration	Wenige größere Kristalle (verwachsen) waren bei geringerer Proteinkonzentration (3-5mg/ml) und hängendem Tropfen bei 500µl Reservoir (wenig Auswirkung) zu verzeichnen. Es gab keine starke Wirkung der Tropfengröße auf die Kristallisation (1µl-3µl).	Eine Proteinkonzentration von ca. 5mg/ml und eine Tropfengröße von 1,5µl + 1,5µl im hängenden Tropfen erzielte die besten Kristalle.
TCEP	Bessere (große) Kristallbildung unter 15% PEG8000, 0,1M Na-Acetetat, 0,1M (NH ₄) ₂ SO ₄ (Abb.10E))	Mit 1mM TCEP in der Proteinprobe wuchsen größere Kristalle mit weniger Defekten.
pH- und Puffervariation (Art und Molarität)	Keine Kristallbildung bei pH5.0 0,1M MES-Puffer, schlechte Kristallbildung pH4.5 Succinat-Puffer, schlechtere Kristallbildung über bzw. unter pH4.5 0 0,1M Na-Acetetat-Puffer oder bei	Die Kristallisation bei pH4.5 im 0,1M Na-Acetattupfer ist am günstigsten.
Variation der Kristallisationstemperatur	Bei 6°C fand keine Kristallisation statt. Hingegen wurden gleiche Kristallisationsgeschwindigkeit bei 18°C-20°C) beobachtet.	Die besten Kristalle entstehen bei einer Temperatur von RT(20°C) bis 22°C.
Variation der Phytatkonzentration	Bis zu einer Phytatkonzentration von 5mM gleichbleibene Kristallisation (15% PEG8000, 0.1M Na.Acetat pH4,5, 0,1M (NH ₄) ₂ SO ₄	Die Phytatkonzentration von 0-5mM hat keinen Einfluss.
Additive Screen (Hampton), Glycerin, Dioxan	Durch Zusatz von Additiven, Glycerin oder Dioxan erfolgte eine schlechtere oder keine Kristallbildung	Die Zugabe von Additiven verschlechterte die Kristallbildung.
Kristallisation unter Öl (Parafinöl) (im Batch)	Bei der Kristallisation im Batch erfolgte eine Kristallbildung bei einer PEG8000 Konzentration von 12-14%, 0,1M Na-Acetetat pH 4,5 und 0,2M (NH ₄) ₂ SO ₄ . Dabei waren in den Ansätzen mit einer Proteinkonzentration von 2,5mg/ml bis 5mg/ml (relativ große) plattenförmige Kristalle.	Im Batch lag die optimale Proteinkonzentration bei 5mg/ml, bei einer Tropfengröße von 1,5µl. Die optimale PEG8000 Konzentration lag bei 12%.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Borriss für die Möglichkeit der Promotion in seiner Arbeitsgruppe der Bakteriengenetik sowie für die Betreuung.

Desweiteren bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Bakteriengenetik für die Unterstützung. Insbesondere gebührt großen Dank Frau Christiane Müller für die technische Unterstützung, ihre Zuverlässigkeit und das stets „offene Ohr“. Weiterhin bedanke ich mich sehr bei Frau Dr. Oliwia Makarewicz und Frau Kristin Rosner für die moralische Unterstützung, die zahlreichen „Denkanstöße“ bei der Lösung von schwierigen Aufgaben sowie für das sehr gute Arbeitsklima.

Besonderen Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Höhne, Frau Dr. Irina Grishkovskaya und Frau Helga Wessner für die Mitarbeit und Unterstützung bei den Kristallisationen, für die Kristallstrukturlösungen und für die Hilfe bei proteinbiochemischen Fragestellungen.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Simon für die Möglichkeit der Durchführung der HPIC-Analysen in seinem Labor und dem wissenschaftlichen Austausch.

Ich danke außerdem Frau Kerstin Böhm für die Strukturlösung der *Klebsiella*-Phytase.

Nicht zuletzt gilt ganz besonderen Dank meiner Familie, meinen Eltern und meiner Lebenspartnerin für den Beistand und die Unterstützung in allen Lebenslagen während dieser Zeit.

Selbständigkeitserklärung

Berlin, den 04.02.2009

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Thomas Herter
